

Aus dem
Veterinär-Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchungen zur Embryotoxizität von Ozon
nach einer *in ovo*-Begasung beim Huhn**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Margrit Thiele
aus Bad Salzungen

Leipzig, 2011

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Uwe Truyen
Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Johannes Seeger

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Johannes Seeger
Veterinär-Anatomisches Institut
An den Tierkliniken 41
04103 Leipzig

Prof. Dr. med. vet. Michael H. Stoffel
Abteilung Veterinär-Anatomie
Universität Bern
Postfach 8466
3001 Bern

Tag der Verteidigung: 11.10.2011

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
2	Literaturübersicht	- 3 -
2.1	Definition und Erzeugung	- 3 -
2.2	Ozontoxizität	- 4 -
2.3	Vorkommen, Wirkung und Anwendung	- 5 -
2.4	Der Hühner - Ei - Test und der Hühnerembryo	- 7 -
2.5	Der Bau der Eischale	- 10 -
2.5.1	Die Schalenhaut	- 11 -
2.5.2	Die Kalkschale	- 11 -
2.5.3	Die Kutikula	- 12 -
2.6	Der Gasaustausch	- 12 -
2.7	Organsysteme	- 16 -
2.7.1	Das Herz	- 16 -
2.7.2	Die Leber	- 17 -
2.7.3	Die Niere	- 18 -
2.7.4	Die Milz	- 19 -
3	Tiere, Material und Methoden	- 21 -
3.1	Chemikalien, Lösungen und Geräte	- 21 -
3.1.1	Begasungsmedium	- 21 -
3.1.2	Fixierungsmedien	- 21 -

3.1.3	Dehydrierungsmedien	- 21 -
3.1.4	Färbemedien	- 21 -
3.1.5	Einbettmedium	- 21 -
3.2	Tiere	- 23 -
3.2.1	Versuche mit Begasung am Brutttag 0	- 23 -
3.2.2	Begasung am Brutttag 3, 4 oder 5	- 24 -
3.3	Methoden	- 25 -
3.3.1	Begasung	- 25 -
3.3.2	Bebrütung	- 26 -
3.3.3	Präparation und Probenaufbereitung für die lichtmikroskopische Untersuchung	- 27 -
3.3.4	Präparation und Probenaufbereitung für die elektronenmikroskopische Untersuchung	- 29 -
3.3.5	Statistische Analyse	- 30 -
4	Ergebnisse	- 31 -
4.1	Ergebnisse der Begasung mit Ozon am Brutttag 0	- 31 -
4.1.1	Auswirkungen auf die Überlebensrate	- 31 -
4.1.1.1	Auswirkungen auf die Überlebensrate bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration	- 31 -
4.1.1.2	Auswirkungen auf die Überlebensrate bei Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration	- 32 -
4.1.1.3	Auswirkungen auf die Überlebensrate bei Begasung mit niedriger Ozonkonzentration	- 33 -
4.1.2	Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung	- 35 -
4.1.2.1	Auswirkungen auf die Gewichte bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration	- 35 -
4.1.2.2	Auswirkungen auf die Gewichte bei Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration	- 37 -
4.1.2.3	Auswirkungen auf die Gewichte bei Begasung mit niedriger Ozonkonzentration	- 38 -

4.1.3	Auswirkungen auf die Längenentwicklung	- 40 -
4.1.3.1	Auswirkungen auf die Länge bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration	- 40 -
4.1.3.2	Auswirkungen auf die Länge bei Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration	- 42 -
4.1.3.3	Auswirkungen auf die Länge bei Begasung mit niedriger Ozonkonzentration	- 43 -
4.1.4	Auswirkungen auf die Organentwicklung	- 45 -
4.1.4.1	Makroskopische Beurteilung der Organentwicklung	- 45 -
4.1.4.2	Mikroskopische Beurteilung der Organentwicklung	- 46 -
4.2	Ergebnisse der Begasung am Brutttag 3, 4 oder 5 mit 5%/ 1h EWZ	- 56 -
4.2.1	Auswirkungen auf das Überleben und den Zeitpunkt des Absterbens bei der Begasung am Brutttag 3, 4 oder 5	- 56 -
4.2.2	Auswirkungen auf die Gewichts- und Längenentwicklung	- 60 -
4.2.3	Ergebnisse der licht- und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen	- 62 -
4.2.3.1	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung	- 62 -
4.2.3.2	Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung	- 63 -
5	Diskussion	- 71 -
6	Zusammenfassung	- 88 -
7	Summary	- 90 -
8	Literaturverzeichnis	- 92 -
9	Anhang	- I -

Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
BAL	Bronchoalveolarlavage
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-x _L	B-cell lymphoma extra large
BT	Brutttag
CAM	Chorion-Allantois-Membran
COP	Cholesterinozonolyseprodukt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EWZ	Einwirkzeit
h	Stunde
HH	Hamburger-Hamilton
Hsp	Hitzeschockprotein
GA	Glutardialdehyd
K	Kontrollen
LOP	Lipidoxidationsprodukte
LPS	Lipopolysaccaride
M	molar
min	Minuten
Oz	ozonierte Tiere
O ₂	Sauerstoff
O ₃	Ozon
PA	Paraformaldehyd
PP	Phosphatpuffer
p.a.	pro anlysi - analyserein
PS	Phasenspezifität

SSL	Scheitel-Steiß-Länge
Tab.	Tabelle
ÜLR	Überlebensrate
V.	Vena
Vv.	Venea
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Ozon gewinnt als potentes Desinfektionsmittel vor allem in der Lebensmittelindustrie an immer größerer Bedeutung. Aus diesem Grund ist es nötig, die Frage nach der „gesundheitlichen Unbedenklichkeit“ dieses chemischen Stoffes hinreichend zu beantworten. Die umfassende toxikologische Untersuchung sämtlicher Stoffe, mit der der Mensch Kontakt hat, ist im Chemikaliengesetz, das am 01.01.1982 in Kraft trat, festgelegt. Im § 1 heißt es: „Zweck des Gesetzes ist es, den Menschen und die Umwelt vor schädlichen Einwirkungen gefährlicher Stoffe und Zubereitungen zu schützen, insbesondere sie erkennbar zu machen, sie abzuwenden und ihrem Entstehen vorzubeugen.“

Der Einsatz von Ozon in der Industrie umfasst bereits ein breites Spektrum. In der Papierherstellung findet es Anwendung beim Bleichen, seine desinfizierende Wirkung wird bei der Reinigung von Getränkeflaschen sowie zum oxidativen Abbau von Arzneimitteln und Hormonen im Abwasser, zur Abluftreinigung und zum Abbau von Keimen und Schadstoffen in Fischzuchtbecken genutzt (HÜBNER 2002). Die Geflügelindustrie setzt es zur Desinfektion der Karkassen während der Schlachtung ein und auch die Anwendung für die Bruteidesinfektion rückt mehr und mehr in den Fokus, da dem bisher standardmäßig zur Bruteidesinfektion verwendeten Formaldehyd auf Grund seiner kanzerogenen Wirkung zukünftig ein Anwendungsverbot droht. Ein großer Vorteil des Einsatzes von Ozon statt Formaldehyd bei der Desinfektion liegt in seiner einfachen, vollautomatisierten Erzeugung, während die des Formaldehyds hingegen an eine verlängerte Zubereitung mit entsprechender gesundheitsschädlicher Exposition gebunden ist. Weiterhin ist die gute Regulierbarkeit des Ozons zu nennen, so dass auch bei Havarien ein schnelles Abschalten möglich ist. Zusätzlich ist die sichere Nutzung des Ozons auch durch die Riechbarkeit - weit unter seinem toxischen Level - gewährleistet (WHISTLER und SHELDON 1989a).

Für das Ziel der Untersuchung, ob und in welcher Anwendung Ozon als alternatives Desinfektionsmittel zum standardmäßig verwendeten Formaldehyd bei der Begasung von Bruteiern eingesetzt werden kann, ist eine direkte Testung am Hühnerembryo unumgänglich, um Aussagen zur unbedenklichen wirtschaftlichen Nutzung machen zu können. Die Untersuchung der Embryotoxizität stellt somit neben dem Nachweis einer deutlichen Reduktion der Salmonellenbelastung auf der Eioberfläche und der Beständigkeit der Eiinhaltsstoffe bei der Begasung mit Ozon einen wichtigen Teilaspekt im Rahmen des Projektes dar.

Die morphologische Studie zum Einfluss der Begasung mit Ozon auf die embryonale Entwicklung des Huhnes erfolgte mit Hilfe der Licht- und Elektronenmikroskopie. Des Weiteren wurden die Vitalität, das Gewicht und die Scheitel-Steiß-Länge der Embryonen erhoben, deren Eier entweder direkt vor der Bebrütung oder an unterschiedlichen Tagen während der Bebrütung mit einem Ozon-Sauerstoff-Gemisch begast wurden. Da die Eischale das Medium für den Stoffaustausch des sich entwickelnden

Hühnerembryos mit der Umwelt darstellt, ist davon auszugehen, dass auch das in seiner chemischen Struktur dem Sauerstoff sehr ähnliche Ozon, über die Eischale in direkten Kontakt mit dem sich entwickelnden Embryo (bei der Begasung während der Bebrütung) bzw. den Zellen im Furchungsstadium (bei der Begasung vor der Bebrütung) tritt.

Das Ziel dieser Dissertation ist eine Erhebung des Einflusses von Ozon auf die embryonale und fetale Entwicklung des Hühnchens, um teratogene Störungen auszuschließen und einen unbedenklichen Einsatz von Ozon als alternatives Desinfektionsmittel in der Bruteibehandlung zu gewährleisten. Diese im Rahmen eines disziplinübergreifenden Projektes erhobenen Ergebnisse nahmen Einfluss auf die Entwicklung eines Prototyps zur Begasung von Bruteiern für den industriellen Einsatz (BRAUN 2005).

2 Literaturübersicht

2.1 Definition und Erzeugung

Ozon ist ein dreiatomiger Sauerstoff, der als blaues Gas mit typischem stechendem Geruch vorliegt. Es ist sehr instabil und wirkt als starkes Oxidationsmittel. Bei -112°C ist es flüssig, bei -119°C erstarrt es. Sein Oxidations-Reduktions-Potenzial beträgt 2,07 V (BRADY und HUMISTON 1978).

Ozon wurde in mehreren Etappen entdeckt und erstmals 1785 von van MARUM als „... eigenartiger Geruch und oxidierender Stoff, der bei Experimenten mit Elektrisiermaschinen auftrat.“ beschrieben. Der Chemiker CHRISTIAN FRIEDRICH SCHONBEIN gab im Jahre 1840 diesem unbekannten Gas den Namen Ozon, was so viel wie „das Riechende“ bedeutet. Die chemische Struktur wurde erst im Jahr 1872 von Brodil erkannt.

Das dreiatomige Molekül wird als vielgestaltige Modifikation des Sauerstoffs gesehen. Seine relative Molekularmasse beträgt 48, und seine Molekularstruktur stellt einen Resonanzhybrid aus den denkbaren Lewis-Strukturformeln dar (Abb. 1), welcher delokalisierte Bindungselektronen aufweist (TRAMBARULO et al. 1953).

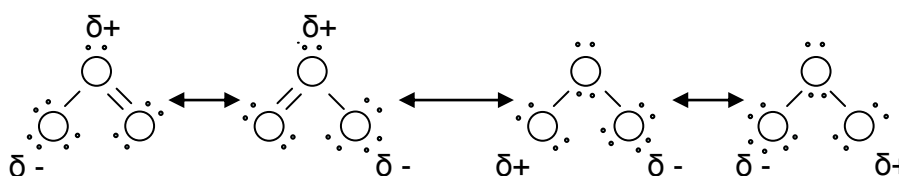


Abb. 1: Resonanzstruktur der Ozonmoleküle

Die Ozonerzeugung wurde 1981 von RICE et al. beschrieben. Dabei muss zuerst die Bindung des zweiatomigen Sauerstoffmoleküls gespalten werden. Die dabei entstehenden Radikale sind sehr reaktiv und bilden mit zweiatomigen Sauerstoffmolekülen das dreiatomige Ozon. Um die O-O-Bindung aufzutrennen, ist eine große Menge Energie notwendig. Ozon kann durch elektrische Entladung, photochemische, chemische, thermale, chemonukleare und elektrolytische Methoden erzeugt werden. Die Erzeugung mit der so genannten Corona-Entladung ist die üblichste Methode. Dabei wird reiner Sauerstoff oder Atemluft in ein Hochspannungswechselstromfeld geleitet (KIM et al. 1999). Die photochemische Erzeugung erfolgt mit ultravioletter Strahlung der Wellenlänge 188 nm. Mit Hilfe der beiden genannten Verfahren können bei Verwendung von Luft ein Ozon/Luft Gemisch von ca. 2-3 % Ozon erzeugt werden. Mit reinem Sauerstoff können bis nahezu 6% (RICE et al. 1981) erreicht werden. Nutzt man die elektrolytische Erzeugung von Ozon in Wasser, so entsteht ein reines O_2/O_3 -Gemisch mit einer Konzentration von über 20 Gewichts%. Die Konzentration kann

nur bis zu einem Punkt gesteigert werden, an dem die Erzeugung und der Zerfall gleiches Niveau haben (MANLEY und NIEGOWSKY 1967). Da Ozon sofort wieder zerfällt, ist eine Lagerung nicht möglich. Es muss stets neu erzeugt werden.

2.2 Ozontoxizität

Die Maximale Arbeitsplatz - Konzentration (MAK) für Ozon liegt bei 200 µg/m³. Es ist bekannt, dass Ozon die menschliche Gesundheit beeinträchtigt. So führt es zu Schleimhautirritationen, respiratorischen Störungen, wie Reizhusten, substernale Schmerzen, Reduktion des Forcierten Maximalen Atemvolumens (FVC) und des Forcierten Expiratorischen Volumens in einer Sekunde sowie zu neutrophilen Entzündungsreaktionen in der Submukosa der Atemwege (ANON. 1996). Es wird vermutet, dass die Toxizität in der Lunge durch die Produkte, die bei der Reaktion von Ozon mit dem Sekret der die Luft leitenden Wege entstehen, im Zusammenhang steht (PULFER et al. 2004). Dieses Sekret besteht zu 95% aus Lipiden (HALL et al. 1998) und es wird angenommen, dass sich die toxische Wirkung des Ozons durch einen Lipidmediator entwickelt, der während der Reaktion von Ozon mit den Lipiden dieses Sekretes entsteht (PRYOR 1995). Verschiedene Studien (KAFOURY et al. 1998, UHLSON et al. 2002) haben gezeigt, dass oxidierte Lipide als Signalmoleküle fungieren können. Von KEINAN et al. (2005) wird die Hypothese vertreten, dass die Entzündungsreaktion bei Asthma einem Circulus vitiosus entspricht. Dabei wird die Schädigung der Atemwege durch Ozon verursacht. Die bei der anschließenden Entzündungsreaktion rekrutierten weißen Blutzellen produzieren bei der Abwehrarbeit selbst wieder Ozon. Das Auftreten von Symptomen bei der Ozonexposition des Menschen zeigt einen deutlich dosisabhängigen Effekt und ist in der Tab. 1 zusammengefasst dargestellt.

Ozonkonzentration	Symptome
ab ca. 100 - 120 µg/m ³	Lungenfunktionsänderungen mit z. B. erhöhtem Atemwiderstand
120 - 140 µg/m ³	Reduzierung der körperlichen Leistungsfähigkeit
150 - 300 µg/m ³	Entzündliche Reaktion der oberen und unteren Atemwege
ab 200 µg/m ³	Subjektive Befindlichkeitsstörung wie Tränenreiz (verursacht durch Begleitstoffe des Ozons), Reizung der Atemwege, Kopfschmerz und Atembeschwerden
240 - 300 µg/m ³	Zunahme der Häufigkeit von Asthmaanfällen

Tab. 1: Zusammenfassung zur akuten dosisabhängigen Symptomatik bei Ozonexposition (MINISTERIUM FÜR UMWELT, LANDWIRTSCHAFT, NATUR- UND VERBRAUCHERSCHUTZ DES LANDES NORDRHEIN-WESTFALEN zitiert vom 04.02.2011)

2.3 Vorkommen, Wirkung und Anwendung

In 15 bis 50 km Höhe (Stratosphäre) über der Erde befinden sich große Mengen Ozon natürlichen Ursprungs. Hier hat es Filterfunktion für die kurzwellige ultraviolette Strahlung vor allem der UV-B-Strahlung der Sonne. Durch UV-B-Strahlung kommt es zu Erbgutschäden in den Zellen der oberen Hautschicht. Ohne Ozon als Filter wäre ein Leben auf der Erde in dieser bestehenden Form nicht möglich. Dagegen hat das in der Troposphäre (vom Erdboden bis 15km Höhe) entstehende Ozon eine schädliche Wirkung. Dieses anthropogene Ozon entsteht aus Vorläufersubstanzen, wie Stickstoffoxiden und Kohlenwasserstoffen. Dabei stammen die Stickstoffoxide aus dem Verkehrsbereich und von Feuerungsanlagen, die fossile Brennstoffe verwenden. Kohlenwasserstoffe sind flüchtige, organische Verbindungen, die beim Einsatz von Lösungsmitteln emittiert werden und ebenfalls im Straßenverkehr entstehen. Erhöhte Ozonwerte treten vor allem in den Sommermonaten auf und können zu Schleimhautreizungen, Kopfschmerzen und entzündlichen Reaktionen der Atemwege und der Lunge führen.

Industriell erzeugtes Ozon hat sich als Desinfektionsmittel bewährt, denn es ist nach elementarem Fluor das stärkste Oxidationsmittel. Erstmals wurde es 1903 im Pariser Abwassersystem eingesetzt (HÜBNER 2002), ab 1907 auch in Nizza und ab 1910 in St. Petersburg (KOGELSCHATZ 1988). Die erste medizinische Verwendung fand Ozon während des ersten Weltkrieges zur Heilung eiternder Wunden. In der Gegenwart findet es Anwendung bei der Behandlung von Verbrennungen, allergischen Reaktionen, arteriellen Durchblutungsstörungen sowie Darm- und Lebererkrankungen (WOLFSTÄDTER und BÜHRING 2001). Neben dieser medizinischen Nutzung umfasst das heutige Spektrum der Anwendung den Abbau von Arzneimitteln und Hormonen im Abwasser, die Abluftreinigung, die Desinfektion von Getränkeflaschen und die Keimreduktion in Fischeaufzuchtbecken sowie den Einsatz in der Papierherstellung (HÜBNER 2002).

Seit geraumer Zeit wird Ozon in Europa auch in der Lebensmittelindustrie verwendet. Die Anwendungsgebiete sind verschieden, so dient es der Oberflächendesinfektion der Nahrungsmittel, der Reinigung der Anlagen der Lebensmittel erzeugenden Betriebe und der Abwasserwiederverwertung (GUZEL-SEYDIM et al. 2004). Darüber hinaus wird es zur Konversion von Grünem Tee zu Schwarzem Tee (GRAHAM, STRUDER und GURKIN 1986, CHANG und SHELTON 1989b) genutzt.

Ein wichtiges Anwendungsgebiet für Ozon findet sich in der Geflügelindustrie zur Desinfektion von Geflügelkarkassen und dem Kühlwasser (YANG und CHEN 1979, SHELTON und BROWN 1986, CHANG und SHELTON 1989a). Auch für die bisher übliche Desinfektion von Bruteiern und Brutapparaten mit Formaldehyd wird Ozon als echte Alternative angesehen. Es ist erwiesen, dass die Fähigkeit von Ozon zur Keimreduktion mit der des Formaldehyds vergleichbar ist (WHISTLER und SHELTON 1989a).

Formaldehyd (CH_2O) ist ein Aldehyd der Ameisensäure. Es ist im reinen Zustand gasförmig, giftig und brennbar und hat einen säuerlich-stechenden Geruch. Die zur Bruteibegasung verwendeten Formaldehyddämpfe werden durch das Mischen und Verdampfen von Wasser, Kaliumpermanganat und Formalin erzeugt. Anschließend erfolgt die Einleitung in die mit Eiern besetzte Kammer. Bei der für Geflügelbestände empfohlenen Mischung für einen Kubikmeter Rauminhalt bestehend aus 42,4 ml Formalin und 21 mg Kaliumpermanganat (WHISTLER und SHELDON 1989b) und einer Behandlungszeit von 20 Minuten wurde eine Reduktion der natürlichen Mikroflora um 99,82% erreicht (WILLIAMS 1970). Die Mikroflora besteht typischerweise aus Mikrokokken, Salmonellen, Pseudomonaden und Escherichien (MAYES und TAKEBALLI 1993) sowie verschiedenen Schimmelpilzen (BRUCE und JOHNSON 1978). Besonders gegenüber Salmonellen ist die sehr gute Desinfektionswirkung von Formaldehyd erwiesen (DORN 1959, WILLIAMS 1970). Diese biozide Wirkung erbringt es durch die Eigenschaft aller Aldehyde ein starkes Reduktionsmittel zu sein. Die Notwendigkeit für den Ersatz des durchaus sehr effektiven und kostengünstig zu erzeugenden Formaldehyds ergibt sich aus dessen nachweislicher Kanzerogenität, die erwarten lässt, dass es zu einem Verbot der Anwendung kommen kann. Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass die Formalindämpfe nur gegen Bakterien wirken, die in direkten Kontakt mit diesen treten, so dass Keime, die sich unter einer Verschmutzung befinden, nicht erreicht werden (KUHLE 1978, LINDACKERS 1998).

Die Begasung von Bruteiern hat sich als eine der effektivsten Desinfektionsmethoden erwiesen, da dabei die Integrität der Eischale als physikalische Barriere für Bakterien am besten erhalten bleibt. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber der Eiwaschung, bei der vor allem die die Poren verschließende Kutikula verloren geht. Deren Verlust wird bei der Begasung kontrovers diskutiert. WHISTLER und SHELDON (1989c) fanden heraus, dass die empfindliche Kutikula durch die Applikation von Gas nicht beeinflusst wird und es auch nur im Rahmen des natürlichen Feuchtigkeitsverlustes zum Anstieg der Permeabilität der Eischale kommt. Die Permeabilität ist ein wichtiger Faktor für den Gasaustausch des sich entwickelnden Embryos. Dagegen zeigten Untersuchungen von BAKER und BALCH (1962), dass es zum Verlust der Kutikula kam, wenn bei der Begasung mit Formaldehyd dieses mit den Kutikulaproteinen reagierte.

Die Wirkungen des Ozons auf die Bakterienzellen wurden vor allem im Rahmen der Nutzung als Desinfektionsmittel in der Lebensmittelindustrie untersucht. Hier steht die Schädigung der Membranbestandteile und der DNS der Bakterien im Vordergrund. Dabei setzt Ozon Schäden an folgenden Zellbestandteilen: (1) an den ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran von Bakterien, (2) den Lipopolysacchariden (LPS) der gram-negativen Bakterien, (3) den intrazellulären Enzymen und (4) dem genetischen Material (KIM, YOUSEF und KHADRE 2003). GIESE und CHRISTENSER (1954) kamen zu der Ansicht, dass Ozon mit den Zellmembranen reagiere. Es wird davon ausgegangen, dass Ozon die ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran oxidiert (MURRAY et al. 1965, SCOTT 1975) und so freie Radikale oder toxische Intermediärprodukte wie Hydrogen-Peroxid

und Aldehyde bildet, welche die Zytotoxizität bestimmen (PRYOR 1991). Die dadurch entstehende Änderung der Membranpermeabilität führt zum Austreten intrazellulärer Bestandteile, zur Schädigung des genetischen Materials und zum Tod des Bakteriums (PRAT et al. 1965, SHECHTER 1973). INGRAM und HAINS beschrieben schon 1949 die Reaktion mit Zelldehydrogenasen, SCOTT 1975 die Interaktion mit der DNA und KIM et al. 1980 die mit der RNA. Die Wirkung des instabilen Moleküls aus drei Sauerstoffatomen entfaltet sich dabei in zwei Schritten: Die schwache Bindung des dritten Sauerstoffatoms ermöglicht diesem direkt als molekularer Sauerstoff schädigend zu wirken und im zweiten Schritt kommt es durch die dabei entstehenden Radikale zur Zerstörung von Zellbestandteilen (KIM et al. 1980).

Die Zellmembran von Eukaryoten besteht hauptsächlich aus einer Lipiddoppelschicht mit Proteinen (LÖFFLER und PETRIDES 1998). Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil der tierischen Zellmembran und hält die Membranfluidität im physiologischen Bereich. Sein Verhältnis zu polaren Lipiden ist variabel. Es besitzt eine Doppelbindung, die für Ozon leicht angreifbar ist (BAILEY 1957). Den bei dieser Autooxidation und Lipidperoxidation entstehenden Produkten konnte eine Zytotoxizität in *in vitro* Systemen nachgewiesen werden (SEVANI et al. 1991). PULFER et al. (2005) konnten in einer Studie an Mäusen die Entstehung dieser Produkte und ihre zellschädigenden Wirkungen auch *in vivo* aufzeigen. Dabei wurden die Tiere drei Stunden Ozonkonzentrationen zwischen 0,5 und 3,0 ppm ausgesetzt und anschließend in den Zellen der Bronchoalveolarlavage (BAL), im zellfreien Überstand der BAL und im Lungenhomogenat der vermehrte Anfall von sogenannten Cholesterinozonolyseprodukten (COP) ermittelt. Die Konzentrationen dieser Produkte stiegen in Abhängigkeit von der applizierten Ozondosis und erreichten so *in vivo* Level, die zu einer Schädigung der epithelialen Auskleidung führten.

Zur Abklärung der Auswirkung auf die Entwicklung der Hühnerembryonen führten WHISTLER und SHELDON (1989b) Schlupfversuche nach Ozonbegasung durch. Dabei wurden 3,03% Ozon auf 36 befruchtete Eier appliziert und diese anschließend bei einer Temperatur von 37,7°C und 50% Luftfeuchte ausgebrütet. Die ermittelte Schlupfrate lag bei nur 50%. Da sie festgestellt haben, dass es zu keiner Beeinflussung der Permeabilität der Eischale kommt, vertreten sie die Hypothese, dass auf Grund des sehr ähnlichen Molekulargewichtes von Ozon zu Sauerstoff und Kohlendioxid, Ozon über die Poren in das Eiinnere eintritt und zum Tod der Embryonen führt (WHISTLER und SHELDON 1989c). Die von QUILLIGAN et al. (1958) durchgeführten Versuche mit einer relativ geringen Dosis von 2 ppm, das entspricht 0,002%, zeigten keinen negativen Einfluss auf die Schlupfrate und die Lebensfähigkeit der Embryonen.

2.4 Der Hühner– Ei –Test und der Hühnerembryo

Für die Beantwortung der zentralen Frage nach einer möglichen Beeinflussung der Entwicklung der Hühnerembryonen durch die Begasung der Bruteier mit Ozon können die Erkenntnisse aus der

Nutzung des Hühnerembryos als Testmodell für Teratogenitätsstudien bzw. zur Prüfung der Embryotoxizität von Stoffen verwendet werden. Dieses etablierte Verfahren kann hier unmittelbar zur Ergebnisfindung genutzt werden, da der Hühnerembryo selbst das zu testende System darstellt und die Prüfstoffapplikation in Form der Begasung mit Ozon auch direkt in der Art und Weise ihres später vorgesehen Einsatzes erfolgt. Dabei bleibt der Punkt der Übertragbarkeit auf die menschliche Spezies unberührt, da dieser im Rahmen des Projektes, Ozon als Desinfektionsmittel für Bruteier anzuwenden, keine Relevanz besitzt. Die stetige Verfügbarkeit und der geringe personelle sowie monetäre Aufwand ermöglichen es, eine große Anzahl von Ergebnissen zu erlangen und so den statistischen Aussagewert, also die Repräsentativität und die Reliabilität der Studie, zu erhöhen.

Die Prüfung der Embryotoxizität von Stoffen berücksichtigt in den letzten Jahren immer mehr den Anspruch der Reduzierung der Tierversuche. Aus diesem Grund unterliegt der standardisierte Hühner-Ei-Test einer weiteren Entwicklung (LÜPKE 1982). Damit ist es möglich, an der aviären Spezies Versuche durchzuführen, die Rückschlüsse auf die Säugetierspezies zulassen. Bereits 1962 formulierte GOERTTLER folgenden Aussage: „Teratologische Experimente und Vergleichsfälle der menschlichen Pathologie haben ergeben, dass hier eine große Übereinstimmung bei allen Wirbeltierspezies besteht. Ist die getestete Substanz beim Hühnchenkeim in der Größenordnung von wenigen Gramm wirksam, muss sie auch für den Menschen als gefährlich gelten.“

Dennoch kam die WHO 1967 zu dem Schluss, dass der Hühnerembryo für die Testung chemischer Substanzen auf Teratogenität nicht geeignet ist (WHO 1967). Die Hauptkritikpunkte waren die Abwesenheit einer vergleichbaren maternal - fetalen Beziehung (Plazenta), die pharmakokinetischen Unterschiede, die sich aus der direkten Applikation des Stoffes auf den Embryo ergeben und die unspezifische Sensitivität, die zu einer hohen Rate an falsch-positiven Befunden führten. Da aber im Laufe der Zeit die Techniken verbessert und vor allem standardisiert wurden und auch das Wissen über speziesvergleichende Embryogenese erweitert wurde, postulierten FISCHER und SCHOENWOLF 1983, dass es sich beim Hühnerembryo um ein verlässliches experimentelles System für embryologische und teratologische Studien handelt.

Die Vorteile der Prüfung am Hühnerembryo liegen laut GOERTTLER (1962) und ZAPP (1976) darin, dass eine direkte Auswirkung des zu testenden Stoffes auf die Entwicklung des Embryos im Ei in jedem Stadium beobachtet werden kann. Abgestorbene Embryonen können durch das Schieren und die dabei mögliche Beurteilung des Chorion-Allantois-Kreislaufs und der Bewegungsfähigkeit des Embryos frühzeitig erkannt werden. Weiterhin kommt es im Ei nicht zur Resorption der abgestorbenen Früchte wie etwa beim Nager, so dass auch Entwicklungsstörungen im Frühstadium erkannt werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass notwendige teratologische Untersuchungen in allen drei Entwicklungsstadien - dem Blastozystenstadium, dem Stadium der Primitiventwicklung und der embryonalen Entwicklungsphase - sehr gut durchgeführt werden können (KREYBIG 1966). So kann eine besondere Sensitivität für den untersuchten Stoff in einer der drei Phasen erkannt werden

(NEUBERT et al. 1977). Erstmals gelang ANCEL 1950 bei Vögeln der Nachweis der selektiven Wirkung verschiedener Verbindungen auf embryonales Gewebe und dessen Sensitivität gegenüber teratogenen Faktoren in bestimmten Entwicklungsstadien. Diese sogenannte „Schwelle der teratogenen Sensitivität“ definiert den Entwicklungszeitpunkt bzw. das Entwicklungsstadium nach deren Überschreitung der Stoff bei der Applikation keine Anomalie mehr hervorruft. Auch ROMANOFF und ROMANOFF (1972) haben in Studien zu angeborenen Missbildungen gezeigt, dass die embryonale Entwicklung der Vögel in verschiedene Phasen eingeteilt werden kann, wobei jede Phase von bestimmten physiologischen Reaktionen auf verschiedene experimentelle Versuche geprägt ist.

Die Untersuchung der Chemoteratogenese kann sowohl direkt als auch indirekt erfolgen. Die direkten Methoden sind dabei sehr vielfältig und umfassen neben der topischen Applikation, also dem direkten Auftropfen auf den Embryo im eröffneten Ei, Injektionen des Prüfstoffes in die Eihäute, die Luftkammer, den Dottersack, den subgerminalen Raum oder in das Gefäßsystem. Die indirekte Applikation durch Bedampfen, Begasung und Tauchen der intakten Eier wird vor allem zum Nachweis der Auswirkungen von Pestiziden und Unkrautvernichtungsmitteln auf die Wildvogelpopulation genutzt (SALOMON 19993).

Bei der Durchführung von Untersuchungen ist es wichtig, die Versuchsbedingungen zu standardisieren. Optimale Bebrütungsbedingungen sind notwendig, da diese direkten Einfluss auf die Lebensfähigkeit sowie die Schlupf- und Missbildungsrate haben. Laut LÜPKE (1982) sind drei Hauptaspekte zu berücksichtigen: die Bedingungen (1) vor der Bebrütung, (2) während der Bebrütung und (3) der Prüfstoffapplikation und deren Verteilung. Zum ersten Aspekt zählen sowohl genetische Faktoren, da bei einzelnen Hühnerstämmen unterschiedliche Embryonalentwicklungszeiten, Spontanabsterberaten und Spontanmissbildungsraten beobachtet werden (MOSELEY 1947, CLEGG 1964), als auch die Lagerungsbedingungen wie Dauer und Temperatur. Während der Bebrütung sind die Parameter Temperatur und relative Luftfeuchte von Bedeutung. Der dritte Aspekt beinhaltet die Applikationsart, den Applikationsort, den Applikationszeitpunkt, das applizierte Stoffvolumen und dessen Verteilung im Ei.

Ob es zur Ausbildung eines embryotoxischen Potentials kommt, hängt laut JELINEK (1982) sowohl von der Dosis, vom sog. kritischen Zeitpunkt, von der Sensitivität des sich entwickelnden Systems gegenüber dem Stoff zum Zeitpunkt der Applikation und vom Vorhandensein eines metabolischen Systems ab, dass den Stoff in einen aktiven oder inaktiven Metabolit umwandelt. Der Vogelembryo besitzt vom 2. Bebrütungstag an ein metabolisches System (JELINEK 1982).

Zum Zeitpunkt der Eiablage ist die Entwicklung des Embryos bis zur Furchung nahezu abgeschlossen (SCHNORR und KRESSIN 2001). Es handelt sich dabei um eine durch partielle diskoidale Furchung entstandene mehrschichtige Keimscheibe, die einer großen Dotterkugel aufliegt. Die oberflächlich liegenden kleinen Zellen werden als Ektoderm bezeichnet bzw. bis zum Zeitpunkt der

Mesodermabscheidung, die erst mit der Bebrütung beginnt auch als Epiblast. Unter diesem Epiblast bildet sich durch Delamination der Hypoblast, welcher bis zur Eiablage zum einschichtigen Entoderm wird. Die beiden Blätter werden von einem Hohlraum (Blastocoel) getrennt und umwachsen die Dotterkugel (SCHNORR und KRESSIN 2001). Diese zweilagige, als Blastoderm bezeichnete Struktur besteht aus ca. 3000 Zellen, den Blastomeren (ROMANOFF und ROMANOFF 1972). In diesem Stadium erfolgt durch die Eiablage eine Unterbrechung der Entwicklung bis die Temperatur des Eies wieder annähernd die der Mutter erreicht hat (PATTEN 1971). Trotzdem weisen die Eier zum Zeitpunkt der Eiablage Variationen innerhalb ihres Entwicklungsstadiums auf (SCHNEIDER und NORTON 1978). Der Grund dafür liegt in einer längeren Verweildauer im unteren Ovidukt, nicht in einer längeren Passagedauer. Wenn Hennen ihre Eier bevorzugt vor 8.00 Uhr morgens oder nach 16.00 Uhr legen, dann wird ein Ei, das später am Tag das Ovidukt erreicht, erst am Morgen gelegt (PATTERSON 1910, ROMANOFF und ROMANOFF 1949). Erwartungsgemäß sind diese Eier weiter entwickelt als die später am Tag gelegten. Weitere Gründe für die Diskrepanz zwischen chronologischem und strukturellem Alter des Embryos können laut HAMBURGER und HAMILTON (1951) unterschiedliche Temperaturen beim Beginn der Inkubation, die unterschiedliche individuelle Größe des Eies und genetische Unterschiede in der Entwicklungsrate bei verschiedenen Rassen sein. Die Fähigkeiten der Blastomeren sind bereits sehr umfangreich. Es konnte nachgewiesen werden, dass sie sowohl eine Fähigkeit zur Apoptose als auch eine Resistenz gegenüber chemischen Noxen und umweltbedingtem Stress durch die Expremierung von anti-apoptotisch wirkenden Genen besitzen. Die Fähigkeit zum frühen programmierten Zelltod, der Apoptose, erscheint notwendig zur Eliminierung aberrierender Zellen und zur Regulation der Zellzahl (BLOOM et al. 1998). Das Gegengewicht zu diesem Zelltodprogramm bilden die anti-apoptotischen Gene und die zytoprotektiven Mechanismen. BLOOM et al. (1998) konnten im frühen Hühnerembryo drei Gentranskripte identifizieren, die die Fähigkeit zur Antagonisierung der Apoptose durch chemische Noxen ermöglichen: die beiden zur anti-apoptotischen Gruppe der bcl- Familie gehörenden Transkripte bcl-2 und bcl-x_L sowie Hsp-70. Im Einzelnen sind die Mechanismen der Wirkung nicht geklärt, doch bcl-2 und bcl-x_L spielen eine Rolle bei der Regulierung der Membranpermeabilität der Mitochondrien (ZAMZAMI et al. 1996) und bei der Blockade der Caspaseaktivität. Letzteres verhindert die Freisetzung von Cytochrom c, welches die Signalkaskade für die Apoptose auslösen würde. Außerdem bietet bcl-2 der Zelle Schutz vor oxidativen Stress, indem es als Radikalfänger fungiert (HOCKENBERY et al. 1993). Das Hsp-70 ist in seiner Funktion als Stabilisator zellulärer Proteine maßgeblich für die Resistenz gegenüber chemischen Noxen verantwortlich (BLOOM et al. 1998).

Laut ROMANOFF und ROMANOFF (1972) haben Studien zu angeborenen Missbildungen gezeigt, dass die embryonale Entwicklung der Vögel in verschiedene Phasen eingeteilt werden kann, wobei jede Phase von bestimmten physiologischen Reaktionen auf verschiedene experimentelle Versuche geprägt ist. Eine wichtige Fähigkeit der Blastomeren in der frühen Phase ist die Totipotenz. Zu dieser

frühen Phase gehört auch die Zeit der Eiablage. Dabei kommt es bei mechanischer Teilung des Blastoderms zur Entwicklung von zwei normalen Embryonen. Weitere Versuche bestätigten die Totipotenz des unbebrüteten Blastoderms bei Vögeln (ROMANOFF und ROMANOFF 1972). Mit dem Beginn der Bebrütung geht diese Totipotenz verloren. Entnimmt man nach 16 h Bebrütung Zellen aus dem bis zu diesem Zeitpunkt entstanden Primitivstreifen und kultiviert diese, so lässt sich bereits je nach Lokalisation der Entnahme eine Potenz für die Entwicklung eines bestimmten Organs nachweisen. Sie zeigen typische histologische Merkmale für das Gewebe. Mit dem Auftreten der Primitivbildungen innerhalb der ersten 24 Stunden der Bebrütung ist der Grundstein für die Mesodermbildung gelegt. Das Auftreten dieser dritten Keimschicht markiert den Übergang zwischen der Entwicklungsperiode in der die Zellzahlvermehrung im Vordergrund stand hin zur Periode in der Differenzierung und Spezialisierung die dominierende Begleiterscheinung des Wachstums darstellt.

2.5 Der Bau der Eischale

Die Schale dient dem Schutz vor und der Kommunikation des Embryos mit der Umwelt.

An der Eischale werden von innen nach außen drei Schichten unterschieden:

- (1) Schalenhaut (Membrana testacea),
- (2) Kalkschale (Putamen ovi),
- (3) Deckschicht (Kutikula).

Die Dicke variiert speziesabhängig und beträgt beim Huhn ca. 0,4 mm.

2.5.1 Die Schalenhaut

Die Schalenhaut besteht aus zwei Anteilen, der äußeren und der inneren Schalenhaut, die eng aneinander liegen und den Abschluss zum Eiklar bilden. Nur im Bereich des stumpfen Pols entfernen sie sich voneinander und formen die Luftkammer. Die Dicke der inneren Membran beträgt ca. 22 µm und die der äußeren ca. 48 µm. Sie bestehen aus einem regelmäßig aufgebauten Fasernetz. Ihre chemische Struktur setzt sich überwiegend aus Proteinen (96%) mit einem hohen Gehalt an Cystein und Hydroxyprolin zusammen. Neben den Proteinen kommen neutrale Polysaccharide vor (MASSHOF und STOLPMANN 1961).

2.5.2 Die Kalkschale

Diese biokristalline Schicht ist 270-380 µm dick (SALOMON 1997) und besteht zu 85% aus anorganischer und 15% organischer Substanz. Der anorganische Anteil ist vorwiegend Kalziumkarbonat. Es lassen sich an der Kalkschale die Mamillenschicht (Stratum mamillarium), die Palisadenschicht (Stratum spongiosum) und die porenähnlichen Kanälchen unterscheiden. Die konisch geformten Mamillen ragen mit ihren apikalen Anteilen (Eiosphärten) in die Schalenhaut und werden

über fibröse Anteile dort verankert. Im zentralen Anteil der Mamillen befindet sich eine Anhäufung von Proteinen, der Basalkegel. Dieser ist Ausgangspunkt der Verkalkung und besteht aus vielen Einzelkristalliten (ERBEN 1970). Die vertikal gerichteten Keile der Basalkegel bilden die spongiöse Lage (ERBEN 1970), die den größten Teil der Kalkschale, die Palisadenschicht, bildet (SALOMON 1993). Sie besteht aus Fibrillen mit einer Länge bis zu 10 μm , die parallel zur Oberfläche der Kalkschale verlaufen, über Anastomosen miteinander verbunden sind und so ein netzartiges Muster bilden (SALOMON 1993). Eine Schicht senkrecht zur Oberfläche angeordneter Calcit-Kristalle (Kristallvertikalschicht) bildet den am weitesten außen liegenden Teil der Palisadenschicht und ist 3 – 8 μm . Für den Gasaustausch mit der Umgebung durchziehen Poren die Palisadenschicht. Diese verengen sich konisch und enden in einer Zone feinkörniger Kalziumkarbonatkristalle, an die sich eine grobkörnige, unregelmäßig gelagerte Schicht anschließt (SIEWERT und BRONSCH 1972, FREEMAN und VINCE 1972). Beim Hühnerei sind die Poren meist unverzweigt (SIEWERT und BRONSCH 1972). Die Anzahl der Poren beim Hühnerei beträgt nach SALOMON (1993) ca. 7000-8000 und laut ROMANOFF und ROMANOFF (1963) findet man die größte Anzahl am stumpfen Pol des Eies. Der Durchmesser variiert außen zwischen 15 – 65 μm und innen zwischen 6 - 23 μm .

2.5.3 Die Kutikula

Dieser auch als Deckschicht bezeichnete Film wird in den Drüsen des Eihalters produziert, um den Eiaustritt zu erleichtern. Durchschnittlich beträgt die Dicke 10 μm (KELLER 1940). Die Kutikula besteht zu 90% aus Proteinen mit einem geringen Kohlenhydratanteil (SIMONS und WIERTZ 1963, BALCH und COOKE 1970). Sie dringt auch in die Poren ein und hat bei frisch gelegten Eiern einen pH-Wert von 7,2 - 7,6. Dieser kann durch den Trocknungsprozess bis auf 8,6 ansteigen (ROMANOFF und ROMANOFF 1963).

2.6 Der Gasaustausch

Der Gasaustausch mit der Umwelt und damit die Versorgung des Embryos findet ausschließlich mittels Diffusion durch die Poren statt, wobei die Permeabilität eine wichtige Rolle spielt (WAGENSTEEN und RAHN 1970, 1971), (FREEMAN und VINCE 1974). Dabei ist zu beachten, dass es sich bei der Eischale um eine mehrschichtige Struktur handelt, deren Anteile auch eine unterschiedliche Permeabilität besitzen. Die „effektive“ Permeabilität für das Ei ist die, der am wenigsten permeablen Schicht. Die Permeabilität wird in $\text{ml} \times \text{cm}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{mmHg}^{-1}$ gemessen und beträgt bei einem unbebrüteten Ei mit intakten Membranen bei 38°C nach ROMIJN (1950) $4,6 \times 10^{-6}$ und laut KUTCHAI und STEEN (1971) $4,2 \times 10^{-6}$. Diese Werte steigen bis auf das 20fache bis zum fünften Bruttag an. Dies ist zur adäquaten Sauerstoffversorgung des Embryos auch nötig, denn verbraucht dieser vor der Bebrütung noch 0,9 $\mu\text{l/min}$ (ROMANOFF 1941) steigt der Bedarf bis zum

Bruttage 19 auf ca. 400 µl/min an (ROMANOFF 1941, ROMIJN und LOKHORST 1960). Die Zunahme der Permeabilität in den ersten Bruttageen beruht dabei vor allem auf dem Wasserverlust, besonders der inneren Schalenhaut (KUTCHAI und STEEN 1971). Der gesteigerte Sauerstoffbedarf des Embryos wird aber noch durch eine Vielzahl weiterer Entwicklungen und Veränderungen gedeckt. So entsteht ein effizientes Kreislaufsystem, der Hämoglobingehalt wird gesteigert, das Blutvolumen wird erhöht und es entsteht die Chorion-Allantois -Membran (CAM) (FREEMAN und VINCE 1974). In den verschiedenen Entwicklungsstadien des Embryos sind damit verschiedene gasaustauschende Organe für die Sauerstoffversorgung zuständig. Dabei sind grundsätzlich vier Phasen zu unterscheiden in denen jeweils verschiedenen Kreislaufelemente eine zentrale Rolle spielen:

- (1) Primärer Kreislauf
- (2) Sekundärer Kreislauf
- (3) Chorion - Allantois - Membran (CAM)
- (4) Internal Pipping („Inneres Schlüpfen“)

Der primäre Kreislauf setzt sich aus den Gefäßen im Embryo und den Dottersackgefäßen zusammen (ROMANOFF 1960), die in der Dottersackwand im Bereich der Area vasculosa eingefasst sind. Die Hämoglobinbildung beginnt nach ca. eineinhalb Bruttageen (BT) (34 h) (THORELL und RAUNICH 1966, WEINTRAUB et al. 1971) und das Blutgefäßsystem entwickelt sich nach etwa zwei Tageen (48 h) (FREEMAN und VINCE 1974). Zur Zirkulation des Blutes kommt es durch die beginnende Herzaktion (Kontraktionen des Herzschlauches) nach 36 bis 48 h Bebrütung. Das Blut gelangt aus der dorsalen Aorta in die rechte und linke Arteria vitellina und anschließend über die Vaskularisierung der Arterien der Area vasculosa in den Sinus terminalis. Dieser führt das Blut über die Venen der Area vasculosa und die Venae vitellinae zurück zum Herz. Der Sauerstoffaustausch mit der Umwelt findet zu diesem Zeitpunkt durch Diffusion über die Eischale und die Membranen statt (CIROTTA und ARANGI 1989).

Der primäre Dottersackkreislauf erfährt bereits ab dem dritten BT starke Modifizierungen, um den gesteigerten Sauerstoffbedarf des wachsenden Embryos zu decken. Der Sauerstofftransport mittels Hämoglobin beginnt mit dem BT 3 (ROMANOFF 1960) und bis zum fünften BT hat sich ein dichtes Netz von Blutgefäßen entwickelt, welches ein Kapillarbett bildet. Da es zur Überbrückung des längeren Transportweges zur Erhöhung des Blutvolumens und damit des Blutdruckes kommt, verstärken sich auch die Kapillarwände. Gefäße dieses sekundären Kreislaufs liegen in zwei Ebenen vor.

Die Entwicklung der beiden Anteile der CAM, die ab dem BT 6 die Sauerstoffversorgung des Embryonen übernimmt, beginnt nach ca. 30 h Bebrütung zunächst getrennt voneinander. Das Chorion entwickelt sich aus dem Trophoblasten und dem parietalen Blatt des lateralen Mesoderms. Zunächst bilden sich kleine rein ektodermale Zotten (primäres Chorion), denen rasch eine mesenchymale

Grundlage gegeben wird (sekundäres Chorion). Die Allantois stellt eine Ausstülpung des Hinterdarmes dar und die Wand besteht folglich aus dem Entoderm und dem viszeralem Blatt des lateralen Mesoderms (SCHNORR und KRESSIN 2001). Die Ausstülpung weitet sich aus und es entsteht der Allantoissack, der das extraembryonale Coelom immer weiter ausfüllt. Dabei umschließt er den Embryo zunehmend und verbindet sich mit dem sekundären Chorion zur CAM (tertiäres Chorion). Diese Fusion findet nach ca. dreieinhalb bis vier Tagen Bebrütung statt und es entstehen dabei eine Vielzahl von Sinusoiden, die so durch die Vergrößerung der Gefäßoberfläche eine verbesserte Sauerstoffversorgung ermöglichen (FREEMAN und VINCE 1974). Im Folgenden breitet sich diese Membran bis zum zwölften BT über die gesamte innere Schalenhaut aus (ACKERMAN und RAHN 1980) und bildet den Hauptort des Gasaustausches, das so genannte Atmungsorgan des sich entwickelnden Hühnerembryos (FREEMAN und VINCE 1974). Zum Zeitpunkt der Entwicklung der CAM liegt bereits ein voll entwickelter an Hämoglobin gekoppelter Sauerstofftransport vor (CIROTTA und ARANGI 1989). Der weiter steigende Bedarf, der ab dem BT 13 nicht mehr vollständig gedeckt werden kann, führt zu einer physiologischen Sauerstoffmangelsituation (FREEMAN und VINCE 1974), der zunächst noch mit einer Steigerung des Blutflusses durch die CAM und einer Erhöhung der Kapillardichte in den sich entwickelnden Organen entgegengewirkt werden kann. Doch mit Erschöpfung dieser kompensatorischen Möglichkeit kommt es ein bis drei Tage vor dem Schlupf zum inneren Schlupf („Internal Pipping“). Dabei wird die innere Schalenhaut zur Luftkammer durchstoßen und der Embryo beginnt bereits im Ei mit regelmäßigen Atemzügen (DUNCKER 1978, PIIPER 1980).

Kommt es zur Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft, sind die Auswirkungen stark vom Zeitpunkt des Auftretens abhängig. Die Bedeutung des Applikationszeitpunktes der Hypoxie auf die Überlebensrate der Embryonen zeigte die Studie von ALTIMIRAS und PHU (2000). Eine Reduktion des O₂ der Bebrütungsluft auf 10% an den BT 2 und 3 zeigte noch keinen Einfluss, aber es war eine deutlich erhöhte Mortalität zu verzeichnen, wenn die hypoxische Episode am BT 4 über 6 h wirkte. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Organe unterschiedliche so genannte „kritische Zeitfenster“ aufweisen, in denen sie besonders empfindlich auf veränderte Umwelteinflüsse wie z.B. hypoxische Zustände reagieren (BURGGREN 1989, DZIALOWSKI et al. 2002, CHAN und BURGGREN 2005). Die Eier wurden innerhalb der Bebrütungszeitfenster BT 1-6 (früh), BT 6-12 (mittel) und BT 12-18 (spät) unter hypoxischen Bedingungen (15% O₂) bebrütet. An allen anderen Bebrütungstagen herrschte Normoxie (21% O₂). Jeweils am BT 12 und BT 18 wurden die Effekte der Hypoxie anhand verschiedener Parameter untersucht. In den Untersuchungen von DZIALOWSKI et al. (2002) zeigte sich dabei eine signifikant verringerte Gewichtsentwicklung der Embryonen am BT 12 bei der Einwirkung der Hypoxie im frühen (BT 1-6) und mittleren (BT 6-12) Bebrütungszeitfenster im Vergleich zu den Kontrollen. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich bei der Untersuchung nach der Applikation von 14% O₂ vom BT 0-10 (MILLER et al. 2002). Diese Befunde

konnten CHAN und BURGGREN (2005) mit ihren Untersuchungen am BT 12 nicht unterstützen. Sie wiesen lediglich eine Auswirkung der Hypoxie auf das Schnabelwachstum nach, wenn diese im frühen Bebrütungsfenster (BT 1-6) wirkte. Die drei Arbeiten kommen zu dem Schluss, dass eine Hypoxie während der ersten sechs bzw. 10 BT keine nachweisbare Auswirkung auf die Gewichtsentwicklung am BT 18 bzw. bis zum Schlupf hat, wenn bis zu diesem Zeitpunkt wieder Normoxie herrscht. Ein „kritisches Zeitfenster“ für die CAM liegt im späten Bebrütungsfenster (BT 12-18). Sie reagiert beim Einwirken von Hypoxie in diesem Zeitraum mit einer deutlichen Massezunahme um eine gleichbleibende Versorgung des Fetus mit Sauerstoff zu gewährleisten (CHAN und BURGGREN 2005). Für das Herz wiesen DZIALOWSKI et al. (2002) eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Hypoxie bei der Einwirkung zwischen BT 6-12 nach. So fanden sie bei der anschließenden Untersuchung am BT 12 eine signifikant erhöhte Herzmasse vor, während CHAN und BURGGREN (2005) beim Einwirken eines verminderten Sauerstoffpartialdrucks in diesem mittleren Bebrütungsfenster (BT 6-12) keine Hypoxie-induzierte Herzhypertrophie nachweisen konnten. Auch für weitere lebenswichtige und toxikologisch bedeutsame Organe wie Leber, Gehirn, Magen, Niere, Darm und die langen Röhrenknochen ergaben sich bei ihren Untersuchungen keine auffallenden Befunde. Jedoch stellten sie eine signifikant verringerte Eigelbmasse bei den untersuchten Eiern am BT 12 im Vergleich zu den Kontrollen fest. Dieser erhöhte Verbrauch der Eigelbmasse scheint dabei keine bleibenden Schäden nach sich zu ziehen, da bei der Untersuchung am BT 12 zwar ein geringeres Schnabelwachstum festgestellt wurde, die Tiere aber bei der Untersuchung am BT 18 nicht mehr von den Kontrollen zu unterscheiden waren. Damit wird deutlich, dass die Eigelbmasse am Beginn der Entwicklung eine wichtige Rolle für die normale Entwicklung unter hypoxischen Bedingungen spielt. Über sie ist es möglich, den erhöhten Energiebedarf beim anaeroben Stoffwechsel zu kompensieren. CHAN und BURGGREN (2005) vertreten somit die These, dass der Embryo in Abhängigkeit von der Dottermasse zu Beginn der Entwicklung eine Art „Sicherheitsfaktor“ besitzt und somit eine „Selbstheilung“ möglich ist. Die Grenzen dieses Systems sind dabei noch nicht untersucht.

Die Auswirkungen einer akuten Hypoxie von zwei, vier bzw. sechs Stunden an den BT 2, 3 und 4 auf die Gewichtsentwicklung von Embryonen und die Herzmasse wurde von ALTIMIRAS und PHU (2000) untersucht. Auch sie konnten bestätigen, dass es nach dem kurzen Wirken einer Sauerstoffmangelsituation in diesem frühen Stadium keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung der Körper- und der Herzmasse bei der Untersuchung am BT 9 gab. Das Fehlen eines nachhaltigen Effektes bei den überlebenden Tieren nach einer akuten Sauerstoffmangelsituation lässt den Schluss zu, dass der frühe Embryo einem Alles-oder-Nichts-Prinzip folgt. Das heißt, dass die Fähigkeit zu Überleben, auf individuellen Unterschieden beruht und nicht auf einem allgemein in der Spezies vorhanden Kompensationsmechanismus (ALTIMIRAS und PHU 2000).

2.7 Organsysteme

In der Toxikologie ist die histopathologische Untersuchung von Organen wie Herz, Leber, Milz und Niere eine unerlässliche Voraussetzung, Lokalisation und Genese der Schädigung durch einen applizierten Fremdstoff zu beantworten. Die Auswahl berücksichtigt dabei, dass das Herz eine zentrale Kreislauffunktion besitzt, die Leber als ein Entgiftungsorgan eine wichtige Stoffwechselfunktion einnimmt, die Niere maßgeblich an der Exkretion von Stoffen beteiligt ist und die Milz ein repräsentativer Vertreter des Immunsystems darstellt (REICHL und SCHWENK 2004).

2.7.1 Das Herz

Die Entwicklung des Herzens und die Entstehung des extra- und intraembryonalen Bindegewebes beginnen in einem sehr frühen Stadium der embryonalen Entwicklung. Die frühesten Anzeichen der Herzentwicklung können im Stadium 4 nach HAMBURGER und HAMILTON (HH 4) (1951), also 24 h nach Bebrütungsbeginn nachgewiesen werden (SISSMANN 1970). Die kardiogene Zone am Kopfende der Keimscheibe ist der Ausgangspunkt der Entwicklung. Hier bilden sich am BT 1 durch Spaltbildung im Mesoderm die paarige primäre Perikardhöhle und die ebenfalls paarige Herzanlage. Dabei bilden sich in der Splanchnopleura längsorientierte Zellstränge, aus denen zwei Endothelschläuche hervorgehen (SCHNORR und KRESSIN 2001). Seitlich dieser Schläuche verdickt sich das Mesoderm zum epimyokardialen Mantel. Aus dem Endothelschlauch geht das Endokard hervor, aus dem epimyokardialen Mantel entwickeln sich das Myokard und das Epikard. Der Grund für das paarige Auftreten ist, dass zu diesem Zeitpunkt der gesamte Embryo noch nach ventral offen ist. Erst mit der in den kommenden Stunden fortschreitenden Abfaltung bewegen sich die paarigen Endothelschläuche aufeinander zu und beginnen nach 29 h Bebrütung (7- Somitenstadium = HH 9) zu verschmelzen und einen einzelnen Schlauch zu formen (PATTEN 1971).

Am BT 3 (25-Somitenstadium = HH 15) werden von kaudal nach kranial fünf Abschnitte am entstandenen Herzschlauch sichtbar: (1) Sinus venosus, (2) Atrium primitivum, (3) Ventriculus primitivus, (4) Bulbus cordis und (5) Truncus arteriosus. Zuerst wird die Einteilung durch das Auftreten oberflächlicher Furchen oder Einziehungen zwischen lokalisierten Aufweitungen sichtbar (ROMANOFF 1960) und das Herz wirkt stumpfkegelig (SEDMERA et al. 1997). Erst jetzt beginnt die Teilung der Ventrikel, indem sich der linke zuerst aufwölbt, gefolgt vom rechten Ventrikel am BT 4 (MÄNNER 2000). Während des BT 5 dehnt sich der rechte Ventrikel aus und der Bulbus cordis sowie der Sulcus interventricularis wird nach links verlagert. Die Vorhofregion beginnt ihre Ausdehnung etwa am BT 2 im 20- Somitenstadium (HH 14). Dabei ist auch hier die Entwicklung der linken Vorhofanteile zunächst stärker wahrzunehmen. So kommt es, dass nach der Herzscheifenbildung im 25-Somitenstadium (HH 16) zunächst der Bulbus vor dem rechten Atrium liegt. Erst mit dessen rapiden Wachstum ab dem 29-Somitenstadium (HH 17) kommt es zur

Verlagerung des Bulbus dorsal des rechten Atriums. Mit weiterer Größenentwicklung sinken der Bulbus und der Truncus arteriosus tiefer zwischen die beiden Atrien (PATTEN 1922). Der Truncus arteriosus der einen Teil des Bulbus in sich aufgenommen hat, wird geteilt und es entstehen der Truncus aorticus bzw. die Aorta mit Verbindung zum linken Ventrikel und der Truncus pulmonalis. Die endgültige herztypische Form wird laut ROMANOFF (1960) etwa am Ende des achten Bebrütungstages erreicht, während SEDMERA et al. (1997) gezeigt haben, dass bereits am fünften Bebrütungstag alle vier Kammern und der Truncus arteriosus äußerlich sichtbar sind und sich eine deutlich Herzspitze geformt hat.

Das im 9- Somitenstadium (HH 9) tubuläre primitive Herz besteht aus einem lockeren Verbund von myocardialen Zellen in 2 Zellschichten, die durch einen Spalt gefüllt mit einer klaren homogenen, gelatinösen Substanz von den endothelialen Zellen getrennt sind. Die Substanz wurde von DAVIS erstmals 1924 als „cardiac jelly“ oder Herzgallerte bezeichnet (MANASEK 1968). Im 10- Somitenstadium (HH 10) hat sich die myokardiale Zellstruktur sichtbar verdichtet und eine definitive Basalzellschicht ist sichtbar. Nach der massiven Dickenzunahme des Myokards wölben sich am dritten und vierten Bebrütungstag balkenartige Strukturen (Trabekel) in die Cavitäten ein, die später durch kompaktes Muskelgewebe ersetzt werden (ROMANOFF 1960). Die Kardiomyozyten sind in den Trabekeln ungeordnet ausgerichtet und es ist noch keine Schichtung der Herzwand erkennbar. Auch SEDMERA et al. (1997) beschreiben das Auftreten von Trabekeln am BT 3 zuerst im rechten Ventrikel dann nach ca. viereinhalb BT auch im linken Ventrikel. Ab dem BT 7 beginnt eine Kompaktierung des Myokards, so dass es zu einer Dickenzunahme der Ventrikelwand kommt und die Trabekel verschwinden (SEDMERA et al. 1997). Diese Kompaktierung beginnt im linken Ventrikel deutlich früher als im rechten (RYCHTER 1981, SEDMERA et al. 1997, SEDMERA et al. 2000). Zeitgleich mit dem ersten Auftreten der Myofibrillen kommt bereits zu sporadischen Kontraktionen die bis zum Somitenstadium 12 (-15) (HH 11) rhythmisch werden (MANASEK 1966). Dennoch ist es fraglich, ob sie auch für die beginnende Kontraktilität des Herzens verantwortlich sind, da ihre Zahl anfangs sehr gering ist (Romanoff 1960). Die noch fehlende regelmäßige Anordnung der Myofibrillen hat zur Folge, dass eine deutliche Querstreifung der Muskulatur nicht zu erkennen ist. Das reife Herz des Huhnes besteht von außen nach innen aus drei Schichten, dem Epikard dem Myokard und dem Endokard.

2.7.2 Die Leber

Die Leber setzt sich embryonal aus mesodermalen und endodermalen Anteilen zusammen (LIEBICH 1993). Die Leber entwickelt sich aus einer ventralen Epithelknospe des hepatopankreatischen Ringes des Duodenums (SCHNORR und KRESSIN 2001). In diese endodermale Leberzellanlage sprießen während der frühen Embryonalentwicklung die Dottersackvenen Vv. vitellinae ein und bilden um die Leberzellplatten ein weit verzweigtes Netz von Leberkapillaren (LIEBICH 1993). Die Primitivanlage

der Leber ist ab dem 22-Somitenstadium (HH 15) (PATTEN 1922) bzw. am Ende des BT 2 erkennbar (ROMANOFF 1960). Mit der Bildung der ventralen Körperwand am BT 3 erreicht die Leber ihre endgültige Position. Schon am BT 4 hat sie deutlich an Größe gewonnen (PATTEN 1922).

Die frühere Annahme, dass die Leber der Vögel in ihrer Feinstruktur der der Säuger ähnelt, entstand durch lichtmikroskopische Untersuchungen von längs angeschnittenen Leberzellsträngen mit den zentral gelegenen Gallenkanälchen. Diese Formation wurde dann vergleichbar zum Säuger als zweilagige Leberzellplatten bzw. Leberzellbalken, die in den Sinusioden liegen, beschrieben (ELIAS und BENGELSDORF 1952, PURTON 1969, HODGES 1972). Erstmals wies ROMANOFF 1960 darauf hin, dass die Leber der Vögel einen von den Säugern abweichenden strukturellen Aufbau zeigt. Die Hepatozyten des Vogels weisen eine pyramidale Form auf und ordnen sich in Form eines dreidimensionalen Netzwerkes von Zellsträngen an. Jeder dieser zylindrischen Zellstränge besteht im Querschnitt aus vier bis sechs Hepatozyten die sich um ein zentral gelegenes Gallenkanälchen formieren bzw. dieses mit ihren apikalen Zellpol bilden. Der basale Zellanteil flankiert die blutführenden Sinusoide, die zwischen den hepatozellulären Zellsträngen entstehen (ROMANOFF 1960, ABDELWAHAB 1987, WONG und CAVEY 1992). Diese Sinusioide bilden ebenfalls ein annähernd gleich großes dreidimensionales Netzwerk mit ähnlicher Verzweigung wie die Leberzellstränge. Dieses doppelte Netzwerk liegt zwischen den Endaufzweigungen der V. porta und den ersten Zuflüssen zur V. hepatica (ADELWAHAB 1987). Dies würde bedeuten, dass anders als beim Säuger, keine Formation um eine Zentralvene stattfindet und eine Lobulierung auf Grund der Gefäßverzweigung ausbleibt.

2.7.3 Die Niere

Die Entwicklung der Harnorgane erfolgt durch die aufeinanderfolgende Ausbildung von drei räumlich getrennten Ausscheidungsorganen: der Vorniere (Pronephros), der Urnieren (Mesonephros) und der Nachnieren (Metanephros) (PATTEN 1922, SCHNORR und KRESSIN 2001). Die Vorniere ist rudimentär und hat keine exkretorische Funktion, ist aber Grundlage für die sich in Folge entwickelnde Ur- und Nachnieren (FREEMAN und VINCE 1974). Die Urnieren, die kaudal der Vorniere etwas später als diese entsteht, ist das Hauptexkretionsorgan während der Embryonalentwicklung des Huhnes, die sich dann bis auf die Anteile, die an der Bildung der indifferenten Keimdrüsenanlage beteiligt sind, bis zum Schlupf ebenfalls zurückbildet. Die definitive Niere des Huhns bzw. des Vogels ist die Nachnieren, die sich ab dem BT 4 kaudal der Urnieren entwickelt. Sie beginnt ihre Funktion ab dem 11. BT (FREEMAN und VINCE 1974). Bereits an der Urnieren lassen sich Urnierenkörperchen, Urnierenkanälchen und ein Urnierenangang unterscheiden. Bis zum Schlupf des Huhnes hat sich dann die Nachnieren aus Ureterknospe und Nachnierenblastem vollständig entwickelt. Die Ureterknospe ist Ursprung für die Ureter, die Nierenbecken, die Nierenkelche und das Sammelrohrsystem. Aus dem Nachnierenblastem entwickeln sich die Nephrone

bestehend aus Glomeruli, Bowmansche Kapsel und dem anschließenden Tubulussystem. Der distale Teil dieses Systems gewinnt dann Anschluss an die Sammelrohre und bildet die Verbindung zwischen Nephronen und dem harnableitenden Weg (SCHNORR und KRESSIN 2001). Die Nachniere stellt sich als dreigeteilte längliche Struktur dar, die sich symmetrisch rechts und links der Wirbelsäule befindet. Histologisch ist keine eindeutige Unterteilung in Mark und Rinde zu finden, da die den Feinbau der Niere bestimmenden birnenförmigen Nierenläppchen teilweise oberflächlich, teilweise in der Tiefe liegen. Diese weisen eine Mark- und eine Rindenzone auf. In der Markzone findet man Abschnitte der Sammelrohre (Tubuli colligentes medullares) und die Henleschen Schleifen der medullären Nephronen. In der Rindenzone (Cortex renalis) findet man Nephronen des medullären und des kortikalen Typs. Die Nephronen des kortikalen Typs besitzen keine Henlesche Schleife und finden sich nur in der Rindenzone. Die medullären Nephronen reichen mit ihrer Henleschen Schleife bis in die Markzone. Das Nephron besteht aus Nierenkörperchen und den Nierenkanälchen (SALOMON 1993). Laut BENOIT (1950) befindet sich in einem Kubikmillimeter Rinde des Vogels eine Anzahl von 90-500 Nierenkörperchen, auch Malpighi-Körperchen genannt (bestehend aus Glomerulum und Bowmansche Kapsel), im Vergleich zu 4-15 bei Säugern.

2.7.4 Die Milz

Die Milz ist ein kleines Organ, das sich rechts an der Grenze zwischen Drüsenmagen und Muskelmagen befindet. Die Form ist kugelig oder zitronen- bzw. eiförmig. Sie besteht aus zwei verschiedenen Arten lymphatischen Gewebes - der roten und der weißen Pulpa. Sehr deutlich ist die anatomische Abgrenzung zwischen diesen funktionell verschiedenen Gebieten jedoch nicht (YASSINE et al. 1989). In dem dreidimensionalen Maschenwerk der roten Pulpa verlaufen die englumigen venösen Sinus. Hier finden Abbau von Erythrozyten, die Blutspeicherung und auch Abwehrprozesse statt, da man sowohl Granulozyten als auch Monozyten und Lymphozyten dort findet. Zur weißen Milzpulpa zählen die lymphatischen Gefäßscheiden und die Milzkörperchen, in denen die Bildung der Immunglobuline stattfindet. Die Milz wird von einer dünnen aus kollagenen Fasern bestehenden Kapsel umgeben. Es kommen nur vereinzelt Trabekel vor (SALOMON 1993). Embryologisch ist sie mesodermalen Ursprungs und ihre erste Anlage ist als Zellkondensation erstmals in der zweiten Hälfte des BT 4 auszumachen. Am BT 5 hat die Milz eine Dicke von 0,025 mm und eine Länge zwischen 0,23 mm und 0,4 mm. Bis zum 6. oder 8. Tag der Bebrütung hat sich aus der Zellansammlung ein Synzytium entwickelt und das Organ ist bereits von einer einfachen Lage von Peritonealzellen überzogen. Die Farbe verändert sich von rötlich am BT 9 zu rot-braun am BT 11. Bis zum BT 20 hat die Milz dann eine Länge von 4 mm erreicht. Myeloide Zellen sind erstmals zwischen dem BT 6 und BT 8 zu erkennen. Sie sind auf Grund ihrer zytoplasmatischen Granula als Anteile der granulozytären Zelllinie zu identifizieren. Bis zum BT 18 ist die Milz an der Granulopoese beteiligt. Nach dem Schlupf verlassen die Granulozyten die Milz. Hämozytoblasten als Vertreter der

roten Zelllinie erscheinen erstmals am BT 10 und sind am BT 12 als Proerythroblasten in großer Anzahl vorhanden. Die Erythropoese findet bis zum BT 15 in den Sinuside statt, danach vermindert sich die Anzahl der Proerythroblasten stetig, bis ab dem BT 18 nur noch reife Erythrozyten sichtbar sind (YASINNE et al. 1989).

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Lösungen und Geräte

3.1.1 Begasungsmedium

Ozon/ Sauerstoffgemisch (O_3 / O_2 in %)

3.1.2 Fixierungsmedien

4% Formaldehydlösung (ROTH)

0,1 molar (M) Phosphatpuffer (PP) pH 7,0 (ROTH)

2% Paraformaldehyd (PA) (SERVA) - 0,5% Glutardialdehyd (GA) (SERVA) in 0,1M PP pH 7,2

2% PA in 0,1M PP pH 7,2

Locke´s Solution Ca-haltig (HOLLBORN UND SÖHNE)

Locke´s Solution Ca-frei (HOLLBORN UND SÖHNE)

Osmiumtetroxid (OsO_4) (ROTH)

3.1.3 Dehydrierungsmedien

Ethanol, vergällt (70% - 100%) (ROTH)

Ethanol DAB, reinst (30% - 100%) (ROTH)

Ethanol Rotisolv® HPLC gradient Grade (ROTH)

3.1.4 Färbemedien

Hämatoxylin nach Gill (MERCK)

Eosinlösung (ROTH)

3.1.5 Einbettmedium

Paraffin (Vogel Histo Comp, VOGEL)

Weitere Chemikalien

Rotihistol (ROTH)

Eiweiß-Glycerin (ROTH)

Entellan (ROTH)

Phosphatpuffer

Calciumchlorid > 95%, entwässert (ROTH)

Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat > 99,5% pro analysi (p.a.) (ROTH)

Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat DAB g (ROTH)
destilliertes Wasser

Geräte und Laborhilfsmittel

Für die Begasung

1. Begasungskammer (Labormaßstab)
 2. Begasungskammer (Prototyp für industriellen Einsatz)
- Ozongenerator (Labor) Ozomet Tech (KASTNER PRAXISBEDARF)
Ozongenerator (Prototyp) BMT 803 (BMT MESSTECHNIK GmbH)
Luftfeuchtigkeitsmesser (BMT MESSTECHNIK GmbH)
Ozonkonzentrationsmessgerät BMT 963 (BMT MESSTECHNIK GmbH)

Für die Bebrütung

Brüter BD-115 (FIRMA BINDER)

Für die Tötung

Di-Ethylether (ROTH)

Für die Lichtmikroskopie

Einbettkassetten (MEDITE)
Objektträger (MENZEL GLÄSER)
Deckgläschen (MENZEL GLÄSER)
Mikrotom (LEICA)
Mikroskop Axioskop (ZEISS) mit Videokamera 3CCD (SONY)

Für die Rasterelektronenmikroskopie

CPD 030 critical point dryer (BAL-TEC)
MED 020 Hochvakuum Kleinbeschichtungsanlage (BAL-TEC)
Rasterelektronenmikroskop (LEO 1430VP)
Probenteller (PLANO)
Kohlenstoffplättchen (PLANO)
Leitsilber (SERVA)
Silica-Gel (ROTH)

3.2 Tiere

Die Untersuchungen wurden an Eiern bzw. Tieren der Rasse Lohmann-Weiss aus der Erzeugergemeinschaft Wildenhain durchgeführt. Die Schlupfrate wird von Lohmann Tierzucht mit 80-83 % angegeben.

Die gelegten Eier wurden, falls nötig nach der Ablage bei 15°C zwischengelagert, am BT 0 begast und anschließend bei 37°C und 75% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Es wurden zwei Begasungsparadigmen verfolgt:

1. Begasung am BT 0
2. Begasung am BT 3, BT 4 oder BT 5

Die Untersuchungen des ersten Paradigma dienten, im Rahmen eines vom Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit geförderten Forschungsprojektes, der Prüfung der Auswirkung der Ozonbegasung von Bruteiern auf die Entwicklung der Küken, um die Frage nach einem möglichen alternativen Einsatz als Desinfektionsmittel zu beantworten. Im zweiten Schritt schlossen sich Untersuchungen zur Auswirkung der Ozonbegasung während der Embryonalentwicklung bzw. in der Organogeneseperiode an, um fundierter Aussagen zur möglichen Embryotoxizität bzw. Teratogenität von Ozon treffen zu können.

3.2.1 Versuche mit Begasung am Bruttag 0

Die verwendeten Eier wurden zufällig in die mit Ozon zu begasende Gruppe und in die als Kontrollen unbegast bleibende Gruppe eingeteilt. Nach der Überführung in die Begasungskammer, in der sie auf rostartigen Trägerebenen separat aufgelegt wurden, wurde ein Ozon-Sauerstoff-Gemisch eingeleitet. Die schubladenartige Anordnung der Trägerebene gewährleistete eine vollständige Begasung der gesamten Eioberfläche. Die Einleitung bzw. die Zufuhr des Ozon-Sauerstoff-Gemisches wurde nach Erreichen der gewünschten Ozonkonzentration gestoppt und die Eier verblieben für eine definierte Einwirkzeit (Minuten, Stunden) in der Kammer. Nach dem Ablauf der Einwirkzeit wurde die Kammer belüftet, die Eier entnommen und zusammen mit den Kontrolleiern in den Brüter umgesetzt. Hier erfolgte die Bebrütung bei 37°C und einer Luftfeuchte von 75%. Diese dauerte je nach Versuch bis zum BT 6, 12, 18, 19 oder 20 (Tab. 2).

Bezeichnung	Ozonierungsparameter		Ende des Versuchs (BT)	Anzahl der	
	Konz.	EWZ		ozonierten Tiere	Kontrollen
hohe Ozonkonzentration 2,51% - 5,22%	>5,0%	1 h	19	30	30
	5,22%	1 h	6, 12, 18	10, 10, 10	10, 10, 10
	5,0%	1 h	6, 12, 18	10, 10, 10	5, 5, 5
	5,0%	0 min	20	10	6
	3,0%	20 min	18	13	5
	2,8%	20 min	19	13	10
mittlere Ozonkonzentration 1,1% - 2,5%	2,5%	40 min	6, 12, 19	10, 10, 10	5, 5, 5
	1,9%	30 min	18	5	4
	1,8%	17 h	19	10	10
niedrige Ozonkonzentration 0,5% - 1,0%	1,0%	2 h	19	10	10
	1,0%	20 min	19	10	8
	1,0%	20 min #	6, 12, 19	10, 10, 10	5, 5, 5
	0,7%	2 h (1)	19	20	10
	0,7%	2 h (2)	19	20	10
	0,5%	24 h	19	10	10
insgesamt				268	173

Tab. 2: Überblick über die durchgeführten Versuche in den drei Konzentrationsgruppen, deren Parameter, der Entnahmetage und die mittels Lichtmikroskopie untersuchte Tieranzahl.

3.2.2 Begasung am Bruttag 3, Bruttag 4 oder Bruttag 5

Für die Untersuchung der Phasenspezifität erfolgte nach der Kennzeichnung der Eier (siehe Kap.3.2.1) die Inkubation im Brüter bei 37°C und 75% Luftfeuchte bis zum Bruttag 3, 4 oder 5. Am entsprechenden Bruttag wurden 10 Eier zur Ozonierung entnommen und 10 Kontrolleier verblieben im Inkubator. Während der ersten Versuchsreihe wurden weitere 10 Kontrolleier für die Dauer der Ozonierung bei Raumtemperatur gelagert. Nach der Ozonierung mit 5% einer EWZ von 1 h wurden alle entnommenen Eier wieder in den Brüter eingesetzt und verblieben in der ersten Versuchsreihe bis zum BT 8 (Tab. 3) und in der zweiten Versuchsreihe bis zum BT 6 im Inkubator (Tab. 4).

Bezeichnung	Brutttag der Begasung	Ozonierungsparameter		Anzahl der	
		Konz.	EWZ	ozonierten Tiere	Kontrollen
PS BT 3 ET 8	3	5%	1 h	20	20
PS BT 4 ET 8	4	5%	1 h	20	20
PS BT 5 ET 8	5	5%	1 h	20	20

Tab. 3: Darstellung der Ozonierungsparameter, sowie der Anzahl der Kontroll- und Versuchstiere der Versuche der Phasenspezifität am Entnahmetag (ET) BT 8.

Bezeichnung	Brutttag der Begasung	Ozonierungsparameter		Anzahl der	
		Konz.	EWZ	ozonierten Tiere	Kontrollen
PS BT 3 ET 6	3	5%	1 h	30	10
PS BT 4 ET 6	4	5%	1 h	30	10
PS BT 5 ET 6	5	5%	1 h	30	10

Tab. 4: Darstellung der Ozonierungsparameter, sowie der Anzahl der Kontroll- und Versuchstiere der Versuche der Phasenspezifität am Entnahmetag (ET) BT 6.

3.3 Methoden

3.3.1 Die Begasung

Die Bruteibegasung im Labormaßstab (Abb. 2) erfolgte nach der Überführung der Eier und dem sicheren Verschluss der Begasungskammer. Dazu wurde der verwendete medizinische Sauerstoff (200 bar, 10 l) zunächst auf 2 bar Arbeitsdruck gemindert und anschließend mit dem in dem Ozongenerator der mittels Corona-Entladung erzeugtem Ozon angereichert und in die Kammer geleitet. Der Einstrom in diese Kammer mit 16,7 l Leervolumen erfolgte im vorderen Bodenbereich, die Ableitung in der Mitte der Rückwand. Mit Hilfe des Messgerätes BTM 963 wurde die erreichte Ozonkonzentration gemessen. Die Abluft wurde durch einen Katalysator geleitet, um das verbliebene Ozon in Sauerstoff umzuwandeln. Des Weiteren erfolgt die Erfassung der Temperatur und der Luftfeuchte. Eine

Erhöhung der Luftfeuchte ermöglichte das Einbringen einer mit Wasser gefüllten Petrischale in die Begasungskammer. War die für den Versuch entsprechende Ozonkonzentration erreicht, wurde der Ozongenerator abgeschaltet und die Sauerstoffzufuhr abgestellt. Die Eier verblieben bis zur festgelegten EWZ in der Kammer. Nach dessen Ablauf erfolgte das Umsetzen in den Brutapparat. Auch der Prototyp weist die gleichen technischen Prinzipien auf. Die Einleitung und gleichmäßige Verteilung des Ozon-Sauerstoff-Gemisches erfolgte über Düsenstöcke. Zuvor wurde das Gemisch mit Wasserdampf befeuchtet. Die Ableitung des Gases erfolgte über die Oberseite zum Katalysator.

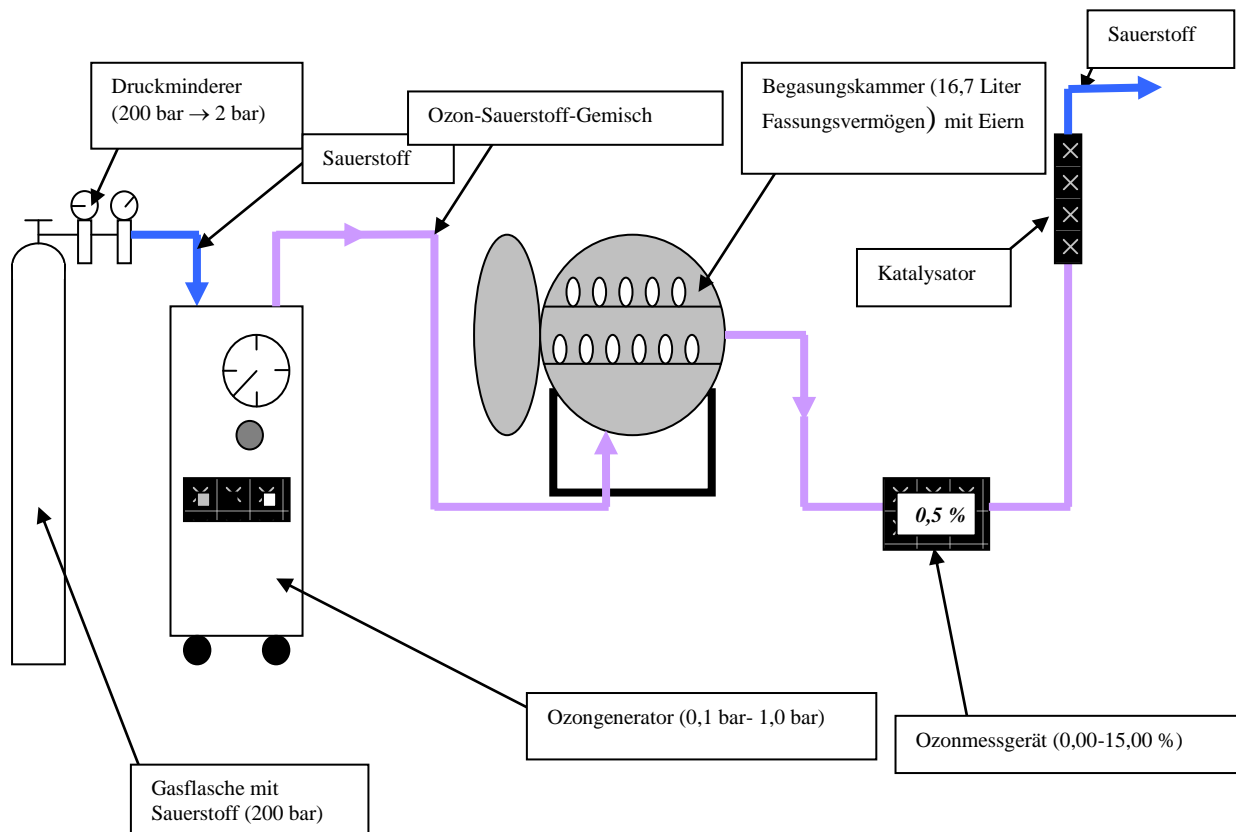


Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Bruteiozonierung im Labor-Maßstab (HABERMANN 2005)

3.3.2 Die Bebrütung

Die Bebrütung der ozonierten Eier und der Kontrollen fand bei 37°C und 75% im gleichen Brutschrank, aber auf verschiedenen Ebenen statt. Zur Präparation wurden die Eier entnommen und bis zur endgültigen Bearbeitung warm gehalten. Die Entnahme der Eier erfolgte innerhalb des ersten Versuchsansatzes (Bebrütung am BT 0) am BT 18, 19 oder 20 und bei vier Versuchsreihen zusätzlich auch am BT 6 und BT 12. Für den zweiten Versuchsansatz (Begasung am BT 3, BT 4 oder BT 5 bzw. Phasenspezifität) existierten zwei Entnahmetage, BT 8 und BT 6.

3.3.3 Präparation und Probenaufbereitung für die lichtmikroskopische Untersuchung

Die Eröffnung des Eies erfolgte am stumpfen Pol und nach Durchtrennung der Schalenhaut wurden als erstes der Allantoiskreislauf und die Spontanbewegungen des Kükens getestet, um Aussagen über die Lebensfähigkeit zu machen. Nach der Untersuchung der Embryonen bzw. der Feten auf Missbildungen und der Ermittlung des Gewichtes sowie der Scheitel-Steiß-Länge erfolgte die Tötung der Tiere nach einer Ethernarkose mittels Dekapitation. Für die Untersuchung zur Phasenspezifität wurden die für die beiden Untersuchungsreihen am BT 6 und BT 8 entnommene Embryonen in toto in 4% Formalin überführt. Bei den Feten der Eier, die am BT 0 begast wurden sowie bei deren Kontrolltieren erfolgte nach der Tötung die Entnahme von Herz, Leber, Milz und Niere. Die Organpräparation begann mit einem Medianschnitt vom Nabel bis zum Hals. Die Leber und die Milz wurden vorsichtig entnommen und in einem vorbereiteten Probengefäß mit 4% Formalin überführt. Im Folgenden wurde das Herz im Bereich der Gefäßabgänge abgesetzt und ebenfalls fixiert. Nach der Entfernung des Verdauungstraktes wurden auch die Nieren entnommen. Die Embryonen oder die Organe wurden bis zur weiteren histologischen Aufbereitung, mind. jedoch 24 h bei 4°C immersionsfixiert. Sie wurden nach ausreichender Fixierung der Paraffineinbettung zugeführt.

Einbettung

Spülung unter fließendem Wasser 8 h

Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe:

70% Ethanol	16 h
80% Ethanol	8 h
90% Ethanol	16 h
96% Ethanol	1,5 h
100% Ethanol	1,5 h
Isopropanol 1	2 h
Isopropanol 2	18 h
Essigsäurebutylester 1	2 h
Essigsäurebutylester 2	2 h

Überführung in Histoplast

Histoplast 1	2 h im Wärmeschränk bei 60°C
Histoplast 2	2 h im Wärmeschränk bei 60°C
Histoplast 3	15 h im Wärmeschränk bei 60°C

Anschließend erfolgte das Verbringen der Proben in mit flüssigem Paraffin gefüllte Silikonabstättformen. Bei Raumtemperatur erfolgte die Aushärtung des Paraffins.

Aufblocken

Die ausgehärteten Paraffinproben wurden auf Holzblöcke aufgebracht, um eine Befestigung am Rotations- oder Schlittenmikrotom zu ermöglichen.

Mikrotomschneiden

Nach dem Antrimmen wurden Organschnitte von 5 - 7µm angefertigt. Diese wurden dann auf mit Eiweißglycerin beschichtete Objektträger aufgezogen und zur Trocknung auf eine Wärmeplatte verbracht.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- | | | |
|--|--------------|-------------------|
| 1. Xylol | 10 min | Entparaffinierung |
| 2. Xylol | 10 min | |
| 3. 96%iger Ethanol | 10 min | Hydrierung |
| 4. 80%iger Ethanol | 10 min | |
| 5. 70%iger Ethanol | 10 min | |
| 6. 50%iger Ethanol | 10 min | |
| 7. Spülen in Aqua dest. | | |
| 8. Eisenhämatoxylin | 4-5 min | Färbung |
| 9. Spülen in Leitungswasser | | |
| 10. Bläuen in Leitungswasser | 10 min mind. | |
| 11. Eosin 3-4 mal schwenken | | Färbung |
| 12. Spülen in Aqua dest. | | |
| 13. Trocknung mit Fließpapier | | |
| 14. 96%iger Ethanol | 2-3 min | Dehydrierung |
| 15. Trocknung mit Fließpapier | | |
| 16. Xylol | 10 min | |
| 17. Trocknung | | |
| 18. Deckgläschen mit Entellan aufbringen | | Eindecken |

3.3.4 Präparation und Probenaufbereitung für die elektronenmikroskopische Untersuchung

Die Eröffnung des Eies erfolgte am stumpfen Pol. Der Hühnerembryo wurde nach der Entnahme gewogen und auf Missbildungen untersucht. Anschließend erfolgte die Tötung des Tieres nach der Ethernarkose mittels Dekapitation und der Kopf wurde in 2% PA/0,5% GA in 0,1M PP zur 2-stündigen Immersionsfixierung überführt. Die weitere Präparation am Embryo erfolgt mit Hilfe des Operationsmikroskopes. Zunächst wurde der Brustbereich vorsichtig in der Medianen vom Nabel ausgehend eröffnet, so dass das Herz sichtbar war. Die morphologische Analyse des sich entwickelnden Herzens sollte im dilatierten Zustand erfolgen. Dazu wurde anschließend mit Hilfe einer Kanüle und einer Tbc-Spritze von dorsal in die linke Herzkammer eingegangen und auf diese Weise eine transkardiale Perfusion zunächst mit Ca-freier Locke's Solution und anschließend mit Ca-haltiger Locke's Solution durchgeführt (MÄNNER 2003). Der Abfluss erfolgte über die rechte Vorkammer. Auch der Torso des Embryos wurde wie der Kopf zwei Stunden immersionsfixiert in 2% PA/0,5% GA in 0,1M PP. Danach wurden sie in 2% PA in 0,1M PP überführt. Die Aufbereitung der Proben wurde nach folgendem Protokoll weitergeführt:

1.Tag

- 3 x 10 min in 0,1 M gekühlten PP waschen
- Fixierung mit 1% Osmiumtetroxid und 0,1 M PP für 90 min bei 4°C
- mal 15 min Waschung mit 0,1 M PP bei 4°C
- 45 min 30% Ethanol, Lagerung bei 4°C
- 45 min 50% Ethanol, Lagerung bei 4°C über Nacht

2.Tag

- 45 min 70% Ethanol, Lagerung bei 4°C
- 45 min 90% Ethanol, Lagerung bei 4°C
- 45 min 98% Ethanol, Lagerung bei 4°C
- 3 x 30 min 100% Ethanol DAB reinst, Lagerung bei 4°C

Critical Point Drying (Kritische-Punkt-Trocknung)

In der höchsten Ethanolstufe erfolgte die Lagerung bis zur anschließend durchgeführten Kritischen-Punkt-Trocknung (Critical Point Drying, CPD). Diese stellt eine Methode dar, um Schäden zu vermeiden, die beim Trocknen von Proben durch die Oberflächenspannung entstehen können. Die Trocknung erfolgte im Gerät CPD 30. Das Prinzip ist den flüssigen Ethanol der Probe in einer

Überdruckkammer schrittweise durch flüssiges Kohlenstoffdioxid (CO₂) zu ersetzen. Im Gegensatz zum Ethanol, kann dieser auf Grund seiner physikalischen Eigenschaften unter absoluter Schonung der Probe anschließend in den gasförmigen Zustand überführt und so vollständig aus dem Gewebe entfernt werden. Dies geschieht durch die Erwärmung der Kammer über die kritische Temperatur von CO₂ von 31°C. Bei einem Druck von 73,7 bar geht das CO₂ ohne Ausbildung einer Phasengrenze und damit ohne Entstehung einer Oberflächenspannung in den gasförmig Aggregatzustand über. Nach der anschließenden Druckentlastung der Kammer erfolgt das Verbringen der Probe auf Silica-Gel-Perlen in ein festverschließbares Gefäß zur weiteren Trockenlagerung. Diese vollständige Entfernung der Flüssigkeit aus der Probe ist nötig, um ein „Nachtrocknen“ des Gewebes unter dem Elektronenstrahl des Rasterelektronenmikroskopes zu vermeiden, was zu einer Schrumpfung mit anschließender Gewebeerstörung führen würde.

Beschichtung der Proben (Sputtern)

Die getrockneten Proben werden auf einen Probenteller mit Hilfe eines Kohlenstoffklebeplättchens aufgebracht und fixiert. Anschließend erfolgt eine Umrandung der Probe mit flüssigem Leitsilber. Diese Maßnahmen dienen der Erhöhung der elektrischen und thermischen Leitfähigkeit der Probe und sollen einer Aufladung der Probe entgegenwirken. Zusätzlich wird die Probe mit Gold beschichtet (Sputtern) um eine gute Emission von Sekundärelektronen zu ermöglichen. Dies geschieht in der Hochvakuum Kleinbeschichtungsanlage MED 020. Anschließend ist die Auswertung per Rasterelektronenmikroskop möglich.

Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie erzeugt Abbildungen, indem ein Elektronenstrahl eine mit einem leitenden Material überzogene Oberfläche rasterartig abtastet, und die bei den Wechselwirkungen mit dem Objekt entstehenden Sekundärelektronen in ein Bild umgewandelt. Sie ermöglicht eine Darstellung von Objektoberflächen mit hoher Tiefenschärfe.

3.3.5 Statistische Analyse

Aus den gemessenen Werten wurde mit Hilfe der Software Microsoft Excel der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (Stabw.) ermittelt. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 10.0 Software (SPSS Software – GmbH München). Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der Oneway Anova Test und der Welch-Test angewendet. Im Falle einer fehlenden Normalverteilung kam der Mann-Whitney Test zur Anwendung. Bei signifikanten Unterschieden wurde der p-Wert angegeben. Es wurden p-Werte unter 0,01 bzw. 0,05 als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Begasung mit Ozon am Brutttag 0

Die erhobenen Befunde der Begasung mit Ozon vor der Bebrütung werden getrennt nach Überlebensrate, Gewichts- und Längenentwicklung dargestellt.

4.1.1 Auswirkungen auf die Überlebensrate

Die Überlebensrate der Embryonen ergab sich aus der Anzahl der eingesetzten Eier in den Brüter gegen die am Entnahmetag lebensfähigen Tiere nach unterschiedlichen Ozonkonzentrationen und EWZ:

4.1.1.1 Auswirkungen auf die Überlebensrate bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration

Bei der Einwirkung einer hohen Ozonkonzentration zwischen 2,8% und 5,22% schwanken die Überlebensraten sehr stark in Abhängigkeit von der EWZ. Die Anwendung der höchsten Ozonkonzentrationen und einer langen EWZ von 1 h ergab eine geringe Überlebensrate (Abb. 3). Die Werte schwanken dabei zwischen 0% (5%/1h), 3,4% (>5%/1h) und 10,0% (5,22%/1h) mit keinem bzw. jeweils nur einem überlebenden Tier und sind damit signifikant geringer als die der Kontrollen ($p < 0,05$). Die eröffneten Eier ohne lebensfähiges Tier wiesen gar keine Entwicklung auf und es lag teilweise eine Durchmischung des Eiklars und des Dotters vor. Einen Anstieg der Überlebensrate auf 60% war bei einer Ozonkonzentration von 5% ohne Einwirkzeit zu verzeichnen. Eine höhere Überlebensrate innerhalb dieser Konzentrationsgruppe zeigte sich bei der Applikation von 2,8% oder 3% Ozonkonzentration und einer EWZ von 20 Minuten mit 71,4 bzw. 90%. Die Überlebensrate der Kontrollen am Entnahmetag schwankt zwischen 83,3 und 100% (Abb. 3). Eine signifikant geringere Überlebensrate im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten auch die für die Versuche 5%/1h und 5,22%/1h untersuchten Embryonen am BT 6 bzw. die Feten am BT 12. Am BT 6 war nur in einem der jeweils zehn untersuchten Eier ein vitaler Embryo während bei den weiteren neun keine Entwicklung zu erkennen war. Ähnlich verhielt es sich bei der Untersuchung am BT 12. Hier wiesen acht bzw. neun der zehn ozonierten Eier keine Entwicklung auf, so dass sich für die Applikation von 5%/ 1h eine ÜLR von 20% und nach Einwirken von 5,22%/1h eine ÜLR von 10% ergab (Abb. 3a).

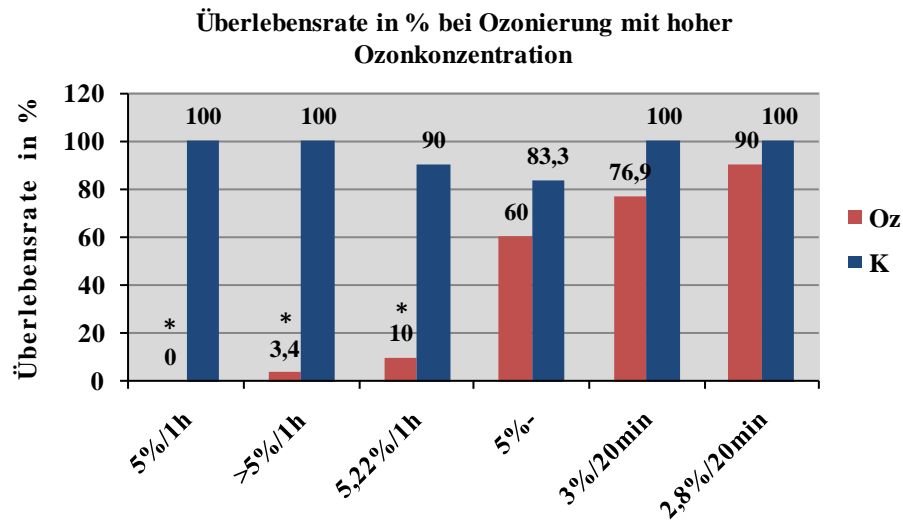


Abb. 3: Die Überlebensrate zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der applizierten Ozondosis und auch von der Kombination der Parameter Ozondosis und Länge der EWZ. * signifikant bei $p < 0,05$.

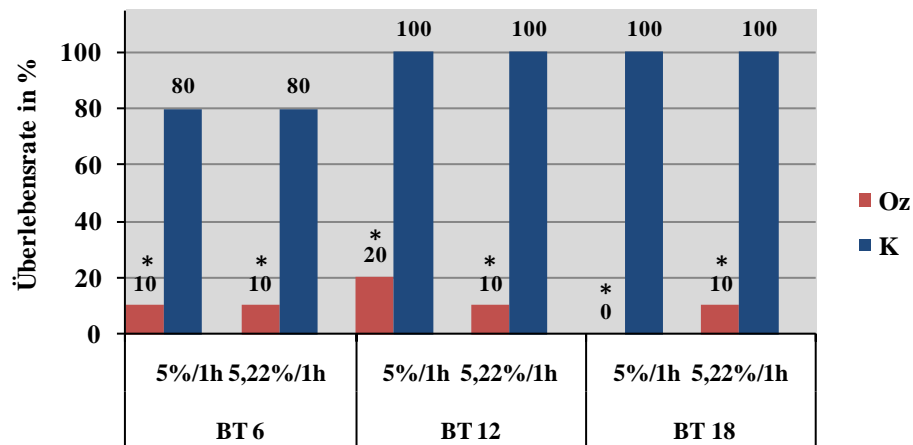


Abb. 3a: Die Überlebensraten nach der Applikation der Kombination 5%/1h und 5,22%/1h sind am BT 6 und BT 12 im Vergleich mit den Kontrollen sehr gering. Diese hohe Mortalitätsrate findet auch am BT 18 ihren Ausdruck, hier konnte kein vitaler (5%/ 1h) bzw. ein vitaler Fetus (5,22%/ 1h) entwickelt werden. * signifikant bei $p < 0,05$.

4.1.1.2 Auswirkungen auf die Überlebensrate bei Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration

Bei mittleren Ozonkonzentrationen und mittleren Einwirkzeiten zeigten die Feten eine deutlich höhere Lebensfähigkeit als in der ersten Versuchsgruppe. Dies spiegelte sich in den Ergebnissen der beiden Versuche 1,9%/30min und 2,5%/40 min mit ÜLR von 100% und 81,8% wider. Eine stark erhöhte EWZ in Kombination mit einer mittleren Konzentration (1,8%/17h) führt zu einer signifikant hohen Fetenmortalität ($p = 0,001$) (Abb. 4). Die zusätzlich erhobenen ÜLR am BT 6 und BT 12 für den

Versuch mit 2,5%/40min ließen bereits erwarten, dass bei dieser Dosis-Zeit-Kombination eine große Anzahl der Feten am BT 19 ebenfalls vital sein würden (Abb. 4a).

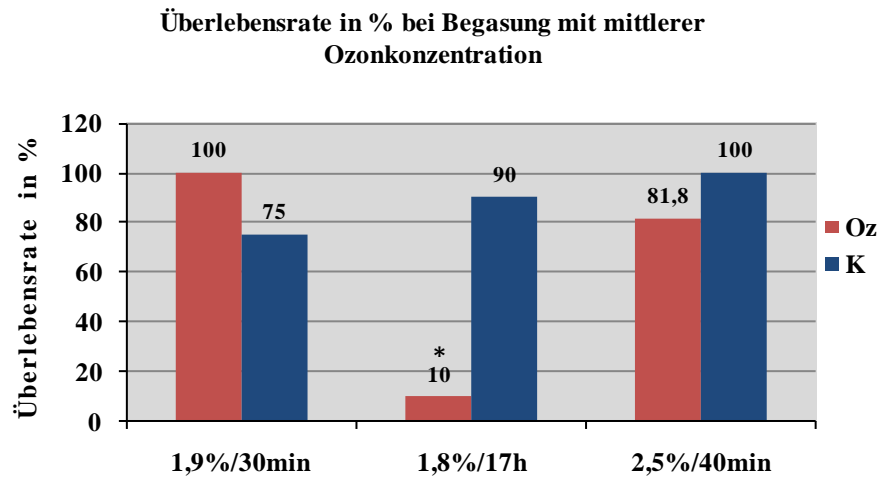


Abb. 4: Eine hohe Überlebensrate zeigte sich nach der Applikation von mittleren Ozonkonzentrationen (1,9% und 2,5%) in Kombination mit Einwirkzeiten von 30 und 40 min. Die Anwendung einer vergleichbaren Ozonkonzentration von 1,8% in Verbindung mit einer sehr langen Einwirkzeit von 17 h führte zu einer signifikant erhöhten Fetenmortalität. * signifikant bei $p < 0,05$.

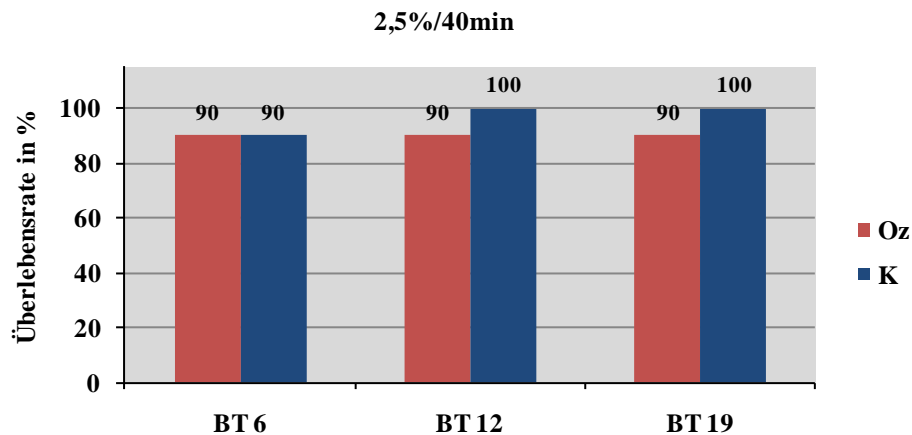


Abb. 4a: Bei der Applikation von **2,5%/40 min** EWZ zeigte an den beiden zusätzlich gewählten Untersuchungszeitpunkten **BT 6** und **BT 12** eine hohe Überlebensrate. Die daraus resultierende Erwartung einer ebenfalls hohen Anzahl vitaler Feten am **BT 19** wurde erfüllt.

4.1.1.3 Auswirkungen auf die Überlebensrate bei Begasung mit niedriger Ozonkonzentration

Eine geringe Sterblichkeit konnte mit dem Einsatz von niedrigen Ozonkonzentrationen erzielt werden. Die Dosen variierten dabei zwischen 0,5% und 1% und wurden mit verschiedenen Einwirkzeiten kombiniert. Die ÜLR in dieser Konzentrationsgruppe liegen mit 90% - 100% im Vergleich mit ihren

Kontrollen (87,5% - 100%) sehr hoch und zeigen keine signifikanten Unterschiede. Selbst bei der Applikation der höchsten Dosis dieser Gruppe von 1% Ozon und einer EWZ von 2 h lag die ÜLR bei 100 %. Dass die niedrigen Konzentrationen dieser Versuchsgruppe auch bei sehr langer EWZ von 24 h keine negativen Auswirkungen auf die Entwicklungen haben, zeigte der Versuch bei dem eine Dosis von 0,5% appliziert wurde. Die ÜLR betrug 90% (Abb. 5). Die sehr hohe Anzahl der vitalen Embryonen und Feten am BT 6 und BT 12 für den zweiten Versuch mit 1% 2h bestätigte sich auch in der hohen ÜLR mit 100% am BT 18 (Abb. 5a).

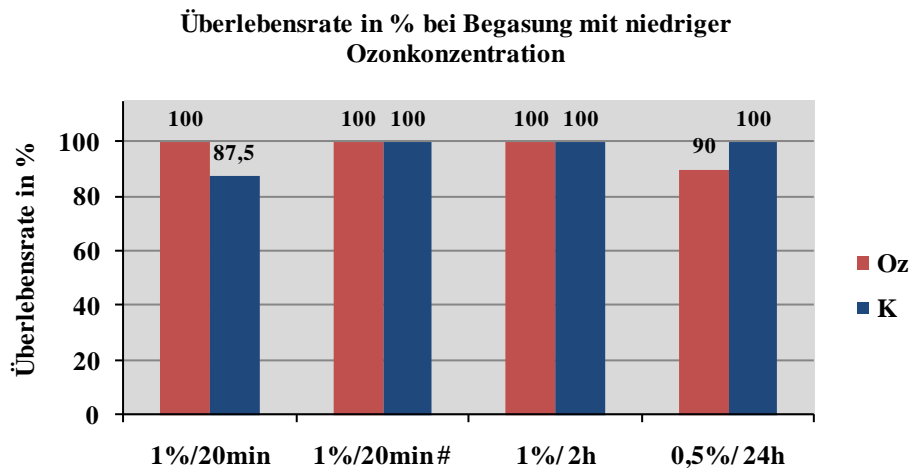


Abb. 5: Die Überlebensraten bei Begasung mit niedrigen Ozonkonzentrationen waren sehr hoch im Vergleich mit ihren Kontrolltieren. Auch die Anwendung in Verbindung mit einer sehr langen EWZ von 2 h bzw. 24 h führte nicht mehr zu einer erhöhten Sterblichkeit.

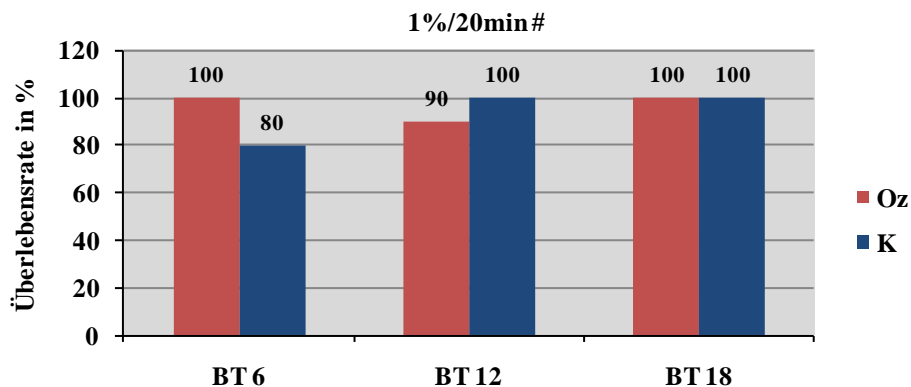


Abb. 5a: Die Überlebensrate bei der Applikation von 1%/ 20min# war an den zusätzlich gewählten Untersuchungstagen BT 6 und BT 12 mit 100% und 90% sehr hoch und stützt die hohe erhobene Lebensfähigkeit am BT 18.

Versuche im Prototyp

Die Nutzung der kleinen Versuchskammer diente der Befunderhebung und war ausschlaggebend für die technische Konzipierung des Prototyps. Bei den anschließend stattfindenden Versuchsreihen im Prototyp wurde eine Ozonkonzentration von 0,7% appliziert, in Kombination mit einer EWZ von 2 h. Die Wahl dieser Parameter ergab sich aus den technischen Möglichkeiten des Prototyps, Erhebungen zur Wirtschaftlichkeit, der zu erwartenden ÜLR und einer genügenden Salmonellenreduktion auf der Eioberfläche. Die ÜLR für die beiden durchgeführten Untersuchungen lagen bei 90% und 100% bei den ozonierten Tieren und bei 80% und 90% bei den Kontrollen (Abb. 5b).

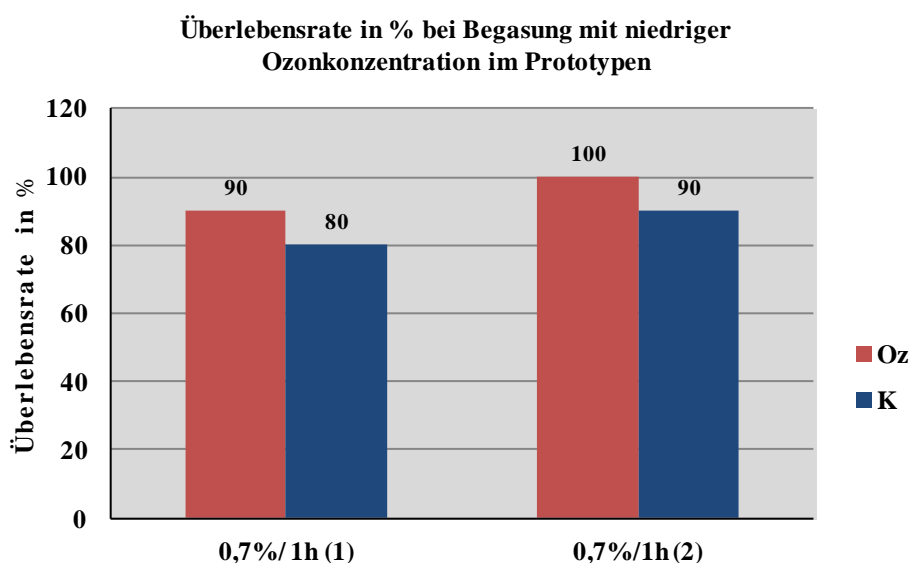


Abb. 5b: Die ÜLR bei der Begasung mit einer niedrigen Ozonkonzentration von **0,7%** in Kombination mit einer EWZ von **2 h** lagen für die beiden Versuchsdurchführungen im Prototyp zwischen 90% und 100%.

4.1.2 Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung

Die Gewichtsentwicklung der Hühnerfeten wurde für alle Versuchsreihen am BT 18, 19 oder 20 erhoben. Für die Gruppe der Begasung mit hoher Ozonkonzentration (2,51% - 5,22%) wurde zusätzlich bei zwei Versuchsreihen (5%/1h und 5,22%/1h) am BT 6 und am BT 12 die Gewichtsentwicklung ermittelt, während dies für die Gruppen der Begasung mit mittlerer (1,1% - 2,5%) und niedriger Ozonkonzentration (0,5% - 1,0%) für je einen Versuch stattfand (2,5%/40min und 1%/20min#).

4.1.2.1 Auswirkungen auf die Gewichte bei der Begasung mit hoher Ozonkonzentration

Die erhobenen Mittelwerte der Gewichtsentwicklung der ozonierten Tiere bis zum BT 18, 19 oder 20 waren mit Ausnahme des Versuchs 2,8%/20min immer geringer als die der Kontrolltiere, ohne signifikant abzuweichen (Abb. 6). Eine auffällig geringere Gewichtsentwicklung war nur bei dem je einzig überlebenden Tier des Extremversuchs >5%/ 1h (erstes Säulenpaar) und dem des Versuchs

5,22%/1h (zweites Säulenpaar) im Vergleich zu den Kontrollen nachweisbar. Während der Mittelwert der Kontrollen bei 27,8 g (>5%/1h) bzw. bei 26,0 g (5,22%/1h) lag, erreichte das überlebende Tier des Versuchs >5%/1h 19,9 g und das des Versuchs 5,22%/1h 19,5 g (Abb. 5). Nach der Begasung mit 5%/1h überlebte kein Tier bis zum BT 18, deswegen konnte auch keine Angabe zur Gewichtsentwicklung erfolgen.

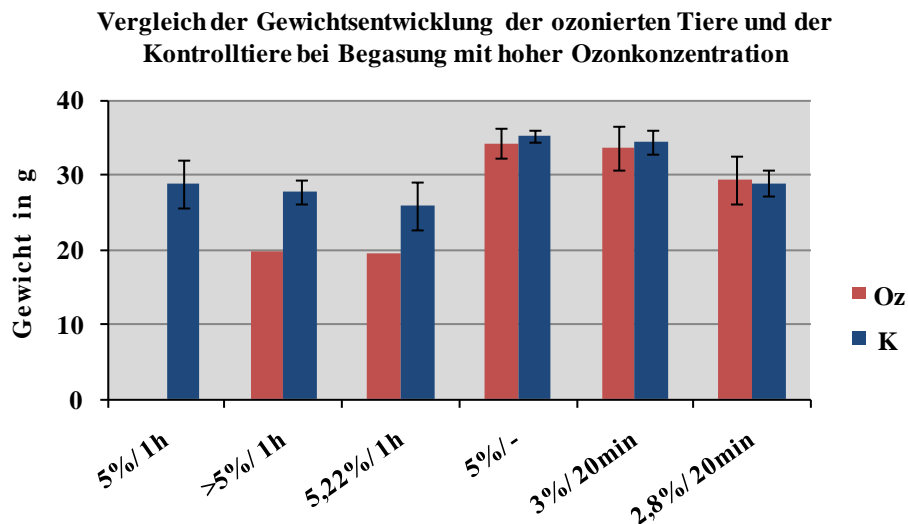


Abb. 6: Die Gewichtsentwicklung bis zum BT 18, BT 19 oder BT 20 bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration in der Kombination mit einer langen EWZ bleibt deutlich hinter denen der Kontrolltieren zurück.

Betrachtet man die Versuche 5%/ 1h und 5,22%/ 1h, bei denen am BT 6 und BT 12 je 10 ozonierte embryonierte Eier entnommen und die Gewichte der Tiere bestimmt wurden, so ist ersichtlich, dass bei beiden Versuchen am BT 6 die ermittelte Gewichtsentwicklung des jeweils einzig überlebenden ozonierten Tieres mit 0,28 g (5%/1h) und 0,25 g (5,22%/1h) um annähernd die Hälfte geringer ist im Vergleich zu den erhobenen Mittelwerten der Gewichte bei den Kontrolltieren mit 0,42 g (5%/1h) und 0,43 g (5,22%/1h) (Abb. 5a). Am BT 12 liegt der Mittelwert für das Gewicht der ozonierten Tiere des Versuchs mit 5%/1h mit 3,94 g unter dem der Kontrollen mit 5,04 g, ohne signifikant geringer zu sein ($p = 0,17$). Das am BT 12 überlebende Tier des Versuchs 5,22%/1h erreicht ein Gewicht von 3,75 g während der Mittelwert der Kontrollen bei 4,73 g lag. Für den BT 18 konnten für den Versuch 5%/1h keine Ergebnisse ermittelt werden, da keines der Tiere dieses Alter erreichte. Das einzig überlebende Tier am BT 18 des Versuches mit 5,22%/ 1h wies eine mit 19,5 g eine geringere Gewichtsentwicklung im Vergleich zu den Mittelwerten der Kontrollen mit 26,0 g auf (Abb. 6a).

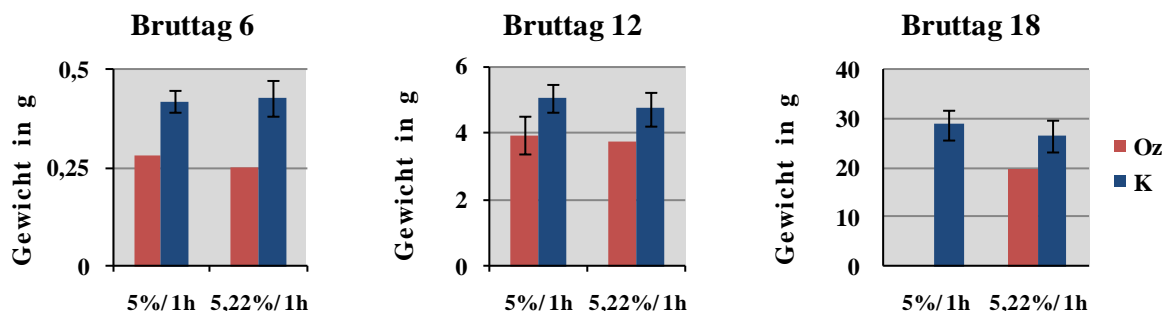


Abb. 6a: Die Gewichtsentwicklung bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration bis zum BT 6, BT 12, BT 18 bei zwei Versuchsreihen blieb an allen drei Untersuchungstagen unter denen der Kontrolltiere, war aber nicht signifikant geringer.

4.1.2.2 Auswirkungen auf die Gewichte bei Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration

In den Versuchen dieser Gruppe, in der Versuche mit mittleren Ozonkonzentrationen zwischen 1,1% und 2,51% durchgeführt wurden, lagen die Mittelwerte für die Gewichte der ozonierten Tiere bei den Versuchen 1,9%/30min und 2,5%/40min mit 29,7 g und 28,0 g nur leicht unter denen der Kontrolltiere mit 31,0 g (1,9%/1h) und 28,5 g (2,5%/40min), ohne dass ein signifikanter Unterschied bestand ($p=0,36$ bei 1,9%/30min und $p=0,52$ bei 2,5%/1h) (Abb. 7). Eine geringere Entwicklung im Gewicht zeigte das einzige überlebende ozoniert Tiere des Versuches 1,8%/17h mit 26,2 g im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen mit 37,8 g.

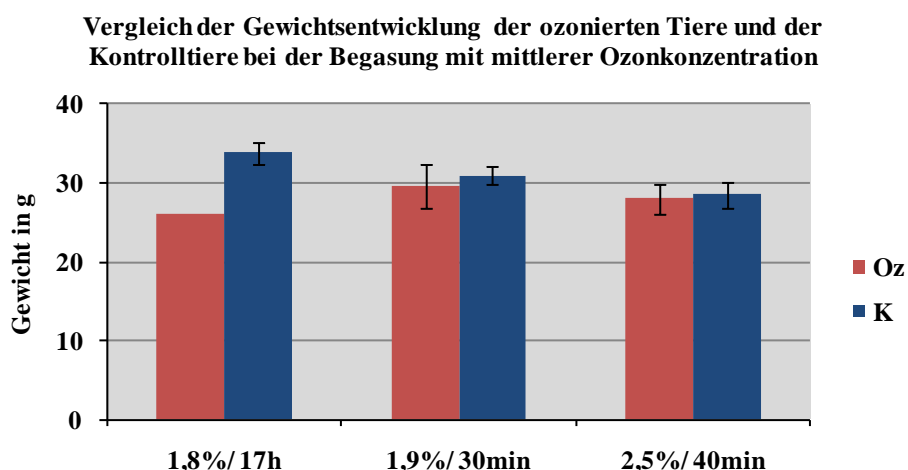


Abb. 7: Vergleich der Gewichtsentwicklung bis zum BT 18 oder BT 19 bei Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration zeigte für den Versuch mit einer sehr langen EWZ eine deutlich geringeres Gewicht des überlebenden Tieres, während bei den beiden Versuchen mit 1,9%/30min und 2,5%/40min die Gewichtsentwicklung der ozonierten Tiere und der Kontrolltiere keine signifikante Abweichung voneinander zeigten.

Die ermittelten Gewichte der ozonierten Tiere und der Kontrollen am Brutttag 6, 12 und 19 wiesen für den Versuch 2,5%/ 40min keine signifikanten Unterschiede auf. Am BT 6 und BT 19 lag der Mittelwerte der ozonierten Tiere dabei leicht unter denen der Kontrolltiere während am BT 12 der Mittelwert für das Gewicht der ozonierten Tiere mit 5,07 g sogar leicht über dem der Kontrollen mit 4,95 g lag (Abb. 7a).

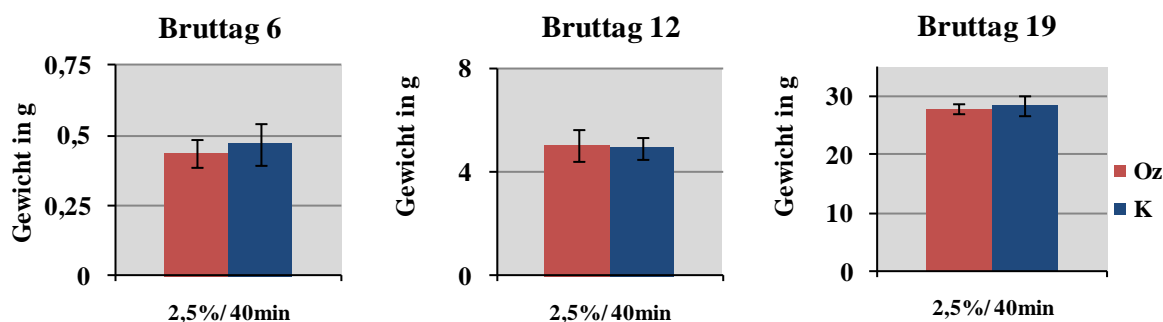


Abb. 7a: Der Vergleich der Gewichtsentwicklung bei dem Versuch 2,5%/ 40 min an den BT 6, BT 12 und BT 19 zeigte zu keinem Untersuchungszeitpunkt einen signifikanten Unterschiede der Gewichte der ozonierten Tiere und ihrer Kontrolliere.

4.1.2.3 Auswirkungen auf die Gewichte bei Begasung mit niedriger Ozonkonzentration

Die Gewichtsentwicklung bis zum BT 18 oder BT 19 der begasteten Tiere zeigte im Vergleich zu den Kontrollen keinen signifikanten Unterschied bei der Applikation von niedrigen Ozonkonzentrationen zwischen 0,5% und 1%. Auch die verlängerte Einwirkzeit von 24 h beim Versuch 0,5%/24h zeigte keinen Einfluss auf die Körpermasse (Abb. 8). Alle überlebenden, ozonierten Tiere wiesen am Tag der Entnahme eine ihrem Alter entsprechende Gewichtsentwicklung auf, wie der Vergleich mit den Kontrolltieren beweist.

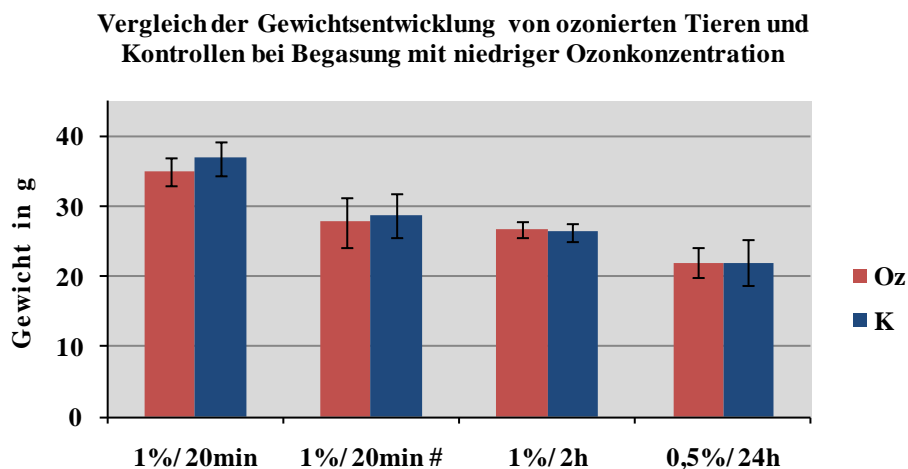


Abb. 8: Die Gewichtsentwicklung bis zum BT 18 oder BT 19 der ozonierten Tiere bei der Begasung mit niedriger Ozonkonzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren wies keine Unterschiede auf.

Die zusätzlichen Untersuchungen des Versuchs 1%/20min# zeigten, dass am BT 6 die Gewichtsentwicklung der ozonierten Tiere signifikant geringer war ($p=0,000$) während am BT 12 eine signifikant bessere Gewichtsentwicklung der ozonierten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen wurde ($p=0,025$). Am BT 18 zeigte sich wieder eine annähernd gleiche Entwicklung (Abb. 8a).

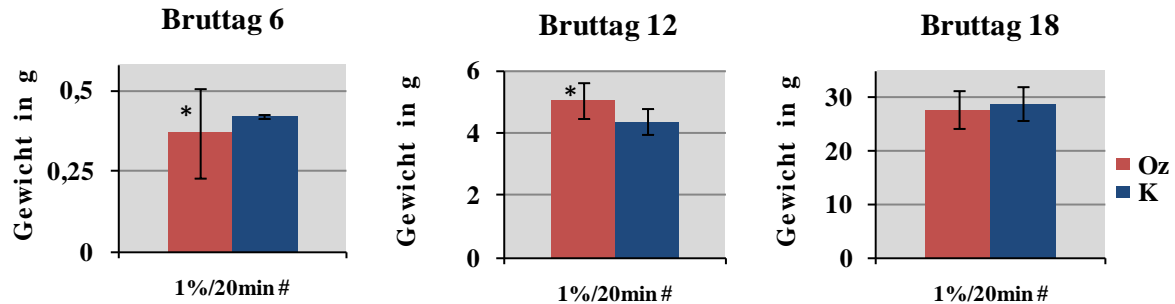


Abb. 8a: Die Erhebung der Gewichte der ozonierten und der Kontrolltiere während der Bebrütung bei der Begasung mit 1%/20min # wies am BT 6 eine signifikant bessere Gewichtsentwicklung der Kontrolltiere nach während sich am BT 12 eine signifikant bessere Gewichtsentwicklung der ozonierten Tiere zeigte. Am BT 18 war kein Unterschied mehr nachweisbar. * signifikant bei $p<0,05$.

Versuche im Prototyp

Die Gewichtsentwicklung der im Prototyp begasten Tiere zeigte in keinem der beiden durchgeführten Untersuchungen eine signifikante Abweichung von den Kontrollen. Ihre Mittelwerte lagen mit 19,3 g (1) und 23,7 g (2) leicht über denen der Kontrollen mit 18,7 g (1) und 23,5 g (2) (Abb. 9).

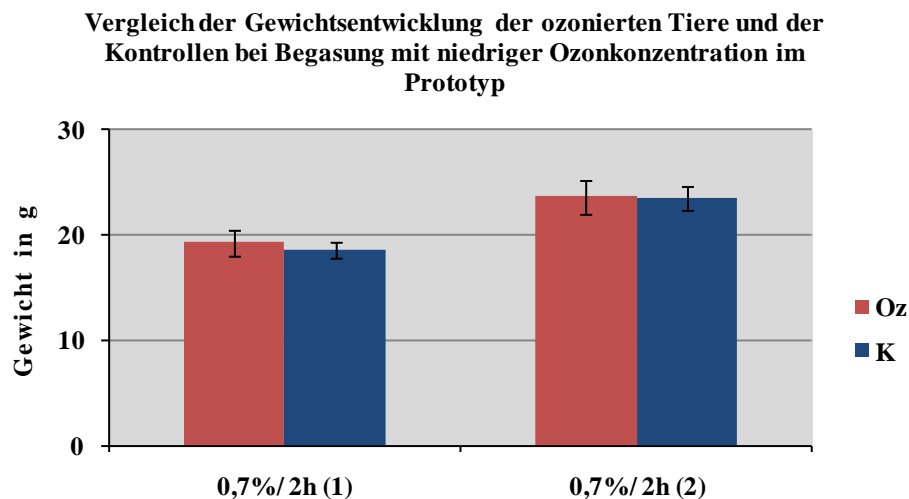


Abb. 9: Die Gewichtsentwicklung bei Begasung mit niedriger Ozonkonzentration im Prototyp zeigte keine Abweichungen im Vergleich zu den Kontrolltieren.

4.1.3 Auswirkungen auf die Längenentwicklung

Für alle Versuchsreihen wurde am BT 18, BT 19 oder BT 20 die Längenentwicklung aufgezeichnet. Wie auch bei der Gewichtsentwicklung wurde für die Gruppe der Begasung mit hoher Ozonkonzentration (2,51% - 5,22%) zusätzlich bei zwei Versuchsreihen (5%/1h und 5,22%/1h) am BT 6 und am BT 12 die Längenentwicklung ermittelt, während dies für die Gruppen der Begasung mit mittlerer (1,1% - 2,5%) und niedrige Ozonkonzentration (0,5% - 1,0%) für je einen Versuch stattfand (2,5%/40min bzw. 1%/20min).

4.1.3.1 Auswirkungen auf die Länge bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration

Die Längenentwicklung der Tiere bis zum BT 18, BT 19 oder BT 20, die durch die Messung der Scheitel-Steiß-Länge beurteilt wurde, ergab, dass die Mittelwerte der Körperlänge der ozonierten Tiere mit einer Ausnahme (2,8%/20min) bei allen Versuchsreihen unter denen der Kontrolltiere lagen. Ein signifikanter Unterschied ließ sich aber bei keiner Anwendung nachweisen. Da bei dem Versuch mit 5%/1h kein Tier bis zum BT 18 überlebte, war kein Vergleich möglich (Abb. 10). Das einzig überlebende Tier des Versuchs >5%/1h wies keine morphologischen Veränderungen auf, ist jedoch mit 10,2 cm deutlich kleiner als das größte (13,0 cm) und das kleinste (11,1 cm) Kontrolltier dieser Untersuchungsreihe (Abb. 11). Der exemplarische Vergleich der größten und kleinsten Feten der ozonierten und der Kontrolltiere bei der Begasung mit 3%/20min zeigte ebenfalls keine entwicklungsmorphologische Abweichung (Abb. 12).

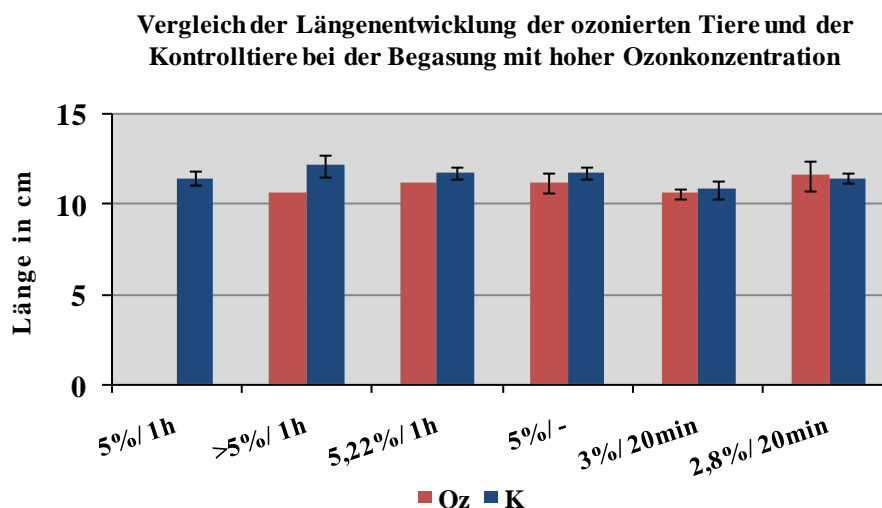


Abb. 10: Der Vergleich der Längenentwicklung der ozonierten Tiere und der Kontrolltiere bei der Begasung mit hoher Konzentration am BT 18, BT 19 oder BT 20.

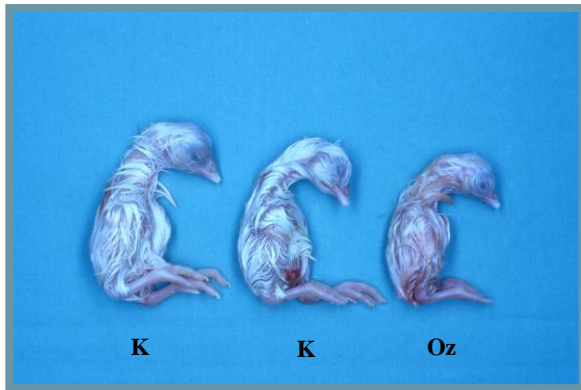


Abb. 11: Der Vergleich des größten und kleinsten Kontrolltieres beim Versuch mit **>5%/1h** (von links) mit dem überlebenden ozonierten Tier (rechts) zeigte keine unterschiedsmorphologischen Unterschiede, das ozonisierte Tier war aber deutlich kleiner.

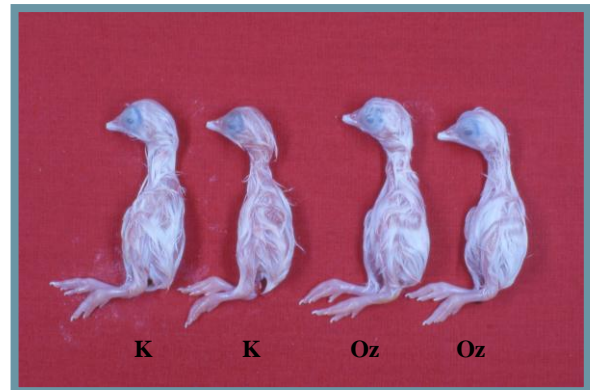


Abb. 12: Nach der Applikation von **3%/20min** zeigte der Vergleich des größten (3.von links) und kleinsten (4.v.l) ozonierten Tieres mit dem größten und kleinsten Kontrolltier (1. und 2. v. links) keine Abweichungen in ihrer Entwicklung.

Die Mittelwerte der Scheitel-Steiß-Länge der begasteten Tiere, die am BT 6 und BT 12 untersucht wurden, waren in beiden Versuchen (5%/ 1h und 5,22%/ 1h) geringer im Vergleich zu den Kontrollen, ohne dass der Längenunterschied für den Versuch 5%/1h am BT 12 signifikant war ($p= 0,32$). Am BT 18 war der Unterschied nicht mehr deutlich, auch wenn die Längenentwicklung des einzigen überlebenden ozonierten Tieres mit 11,2 cm wieder geringer war als der Mittelwert der Kontrolltiere mit 11,8 cm (Abb. 13).

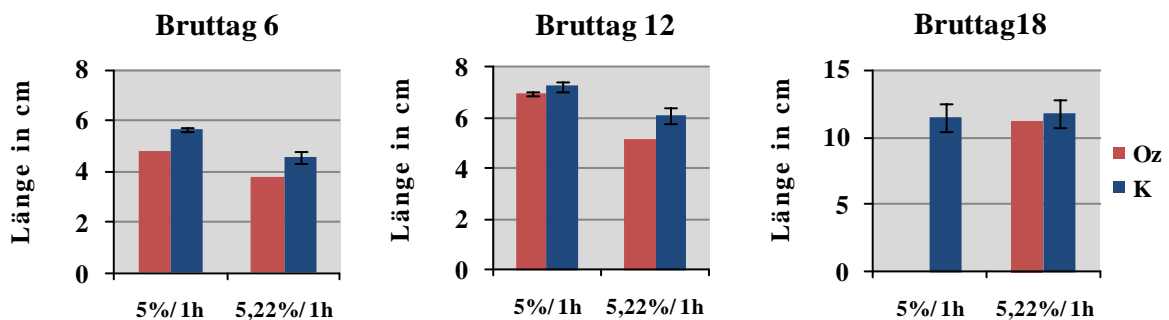


Abb. 13: Der Vergleich der Längenentwicklung der ozonierten Tiere und der Kontrolltiere bei den Versuchen mit **5%/1h** und **5,22%/1h** am **BT 6**, **BT 12** und **BT 18** zeigt, dass die überlebenden ozonierten Tiere bzw. die Mittelwerte stets unter denen der Kontrolltiere blieben.

4.1.3.2 Auswirkung auf die Länge bei Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration

Bei der Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration lagen am BT 18 und BT 19 die Mittelwerte für die Scheitel-Steiß-Länge der ozonierten Tiere für die Versuche mit 1,9%/30min und 2,5%/40min mit 10,7 cm und 12,3 cm sogar leicht über denen der Kontrolltiere mit 10,5 cm und 12,1 cm (Abb. 14). Eine deutlich geringere Entwicklung der Scheitel-Steiß-Länge zeigte das einzige überlebende ozonisierte Tier des Versuches 1,8%/17h mit 9,5 cm im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen mit 11,3 cm.

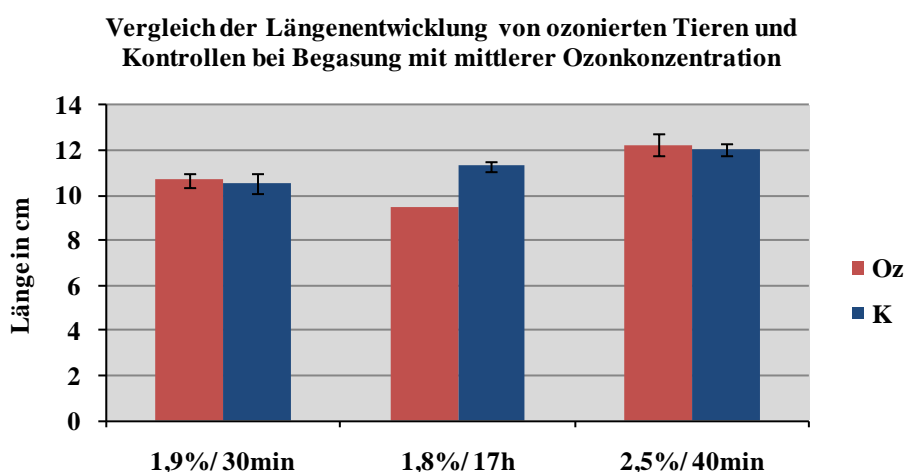


Abb. 14: Die Mittelwerte der Längenentwicklung der ozonierten Tiere der Versuche 1,9%/30min und 2,5%/40min zeigen keine signifikanten Unterschiede zu denen ihrer Kontrolltiere und lagen sogar leicht über ihnen. Das überlebende Tier des Versuchs 1,8%/17h war mit 9,5 cm deutlich kleiner als das Mittel der Kontrollen mit 11,3 cm.

Die ermittelten Werte für die Längenentwicklung am BT 6, 12 und 19 des Versuchs 2,5%/40min wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Der Mittelwert der ozonierten Tiere am BT 6 lag mit 4,4 cm noch leicht unter dem Wert der Kontrollen mit 4,7 cm. Am BT 12 und 19 erreichten die Feten im Mittel 6,6 cm und 12,3 cm und waren damit im Vergleich zu den Kontrollen mit 6,4 cm und 12,1 cm etwas größer (Abb. 14a).

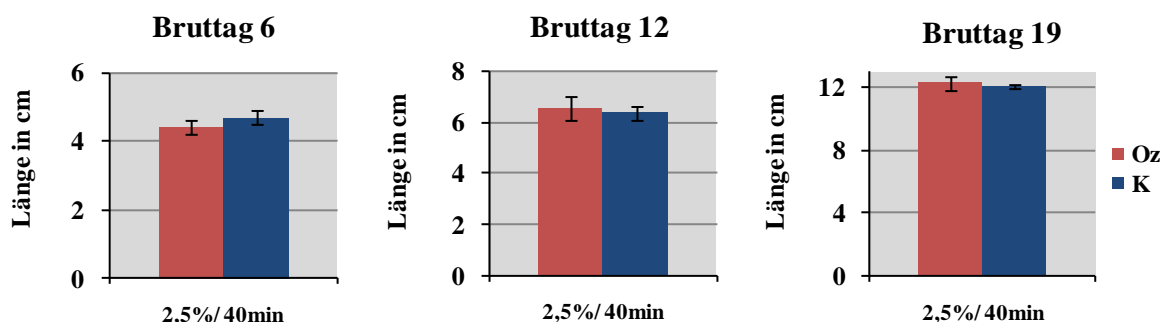


Abb. 14a: Die Längenentwicklung der ozonierten Tiere und Kontrolltiere des Versuchs 2,5%/40min bis zum BT 6, BT 12 und BT 19 wies keine signifikanten Unterschied auf. Am BT 12 und BT 19 lagen die Mittelwerte der ozonierten Tiere mit 6,6 cm und 12,3 cm leicht über denen der Kontrolltiere mit 6,4 cm am BT 12 und 12,1 cm am BT 19.

4.1.3.3 Auswirkungen auf die Länge bei Begasung mit niedriger Ozonkonzentration

Bei keinem der durchgeführten Versuche mit einer niedriger Ozonkonzentration zwischen 0,5% - 1% konnte am BT 18 oder BT 19 ein signifikanter Unterschied der Längenentwicklung zwischen den begasten Tieren und den Kontrolltieren festgestellt werden (Abb. 15). Der Mittelwert für die Längenentwicklung bei den begasten Tieren im Versuch 1%/2h lag mit 11,3 cm leicht über dem der Kontrolltiere mit 11,1 cm, während er bei den weiteren Versuchen dieser Gruppe stets unter denen für die Kontrolltiere blieb (Abb. 15).

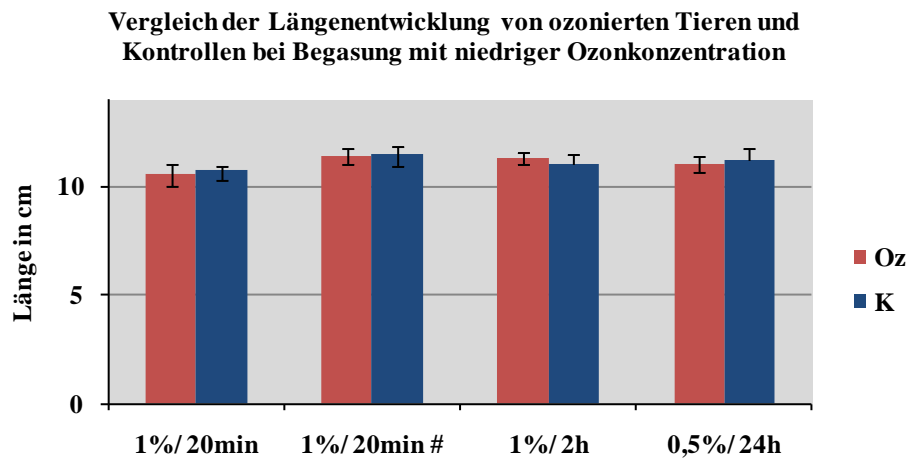


Abb. 15: Der Vergleich der Längenentwicklung bei der Begasung mit niedriger Ozonkonzentration zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der ozonierten Tiere und ihrer Kontrolltiere am BT 18 oder BT 19.

Die Erhebung der Längenentwicklung bei der Begasung mit niedriger Ozonkonzentration erbrachte für den Versuch 1%/20min am BT 6 noch eine signifikant geringere Längenentwicklung der ozonierten Tieren. Sie wurden im Mittel 5,24 cm lang, während die Kontrolltiere 5,68 cm erreichten. Am BT 12 lag der Mittelwert der ozonierten Tiere mit 7,31 cm leicht über dem der Kontrollen mit 7,08 cm, ohne signifikant erhöht zu sein. Bis zum BT 18 näherten sich die ozonierten und die Kontrolltiere dann in der SSL wieder einander. Der Mittelwert für die SSL der begasten Tiere lag mit 11,4 cm nur leicht unter den ermittelten SSL der Kontrolltiere mit 11,5 cm (Abb. 15a).

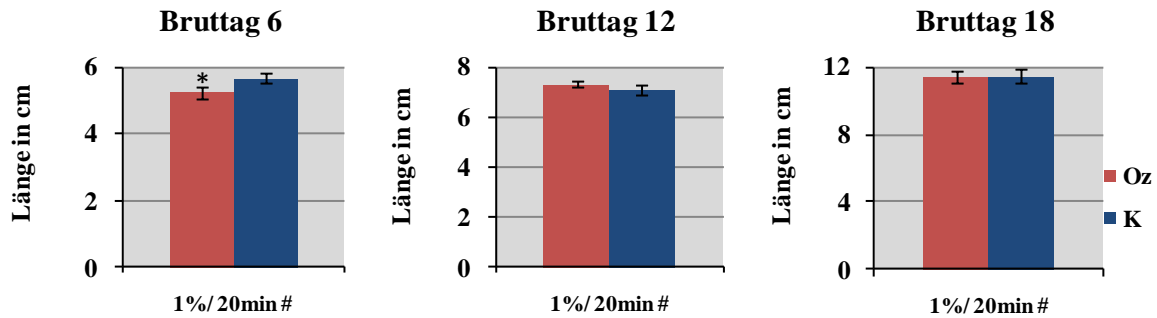


Abb. 15a: Der Vergleich der Längenentwicklung der ozonierten Tiere und der Kontrolltiere beim Versuch **1%/20min #** zeigte nur am BT 6 eine signifikant geringere Entwicklung der ozonierten Tiere. Am BT 12 lag der Mittelwert leicht über dem der Kontrolltiere am BT 18 lag er mit 11,4 cm leicht unter dem der Kontrolltiere mit 11,5 cm. * signifikant bei $p < 0,05$.

Versuche im Prototyp

Die Mittelwerte für die Längenentwicklung bei den beiden Versuchsdurchgängen (1) und (2) mit 0,7%/2h im Prototyp wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen ozonierten Tieren und Kontrollen auf. Während im ersten Versuchsdurchgang der Mittelwert der ozonierten Tiere leicht unter dem der Kontrollen liegt, lag der Mittelwert der Begasungsgruppe im zweiten Versuch mit 11,5 cm leicht über dem der Kontrollen mit 11,4 cm (Abb.16).

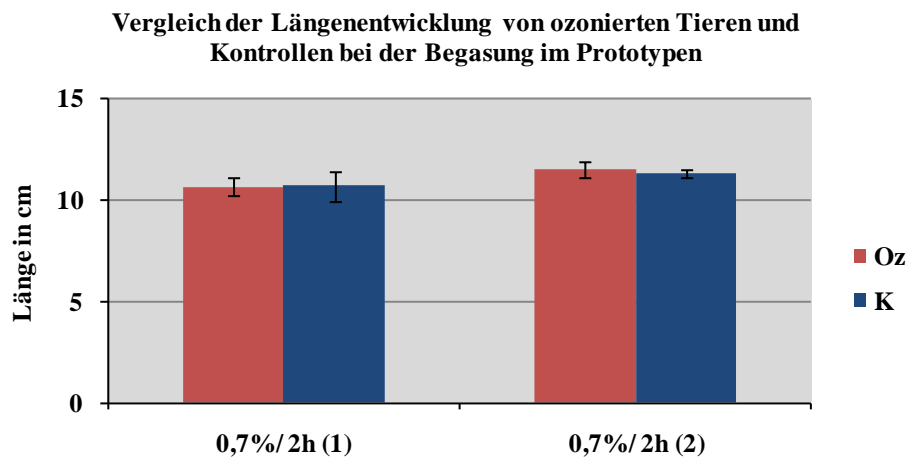


Abb. 16: Der Vergleich der Längenentwicklung bei der Begasung mit niedriger Ozonkonzentration im Prototyp zeigte keine Abweichungen zwischen den ozonierten Tieren und den Kontrolltieren.

4.1.4 Auswirkungen auf die Organentwicklung

4.1.4.1 Makroskopische Beurteilung der Organentwicklung

Zum Zeitpunkt der Untersuchung der Organe am BT 18 oder 19 oder 20 bzw. bei zwei Versuchsreihen auch am BT 12 waren diese vollständig bei allen ozonierten Tieren angelegt und differenziert. Die makroskopische Untersuchung von Leber, Herz, Nieren und Milz der ozonierten Tiere im Vergleich mit den Organen der Kontrolltiere wurde für jeden Versuch durchgeführt. Die am BT 6 entnommenen Tiere wurden ohne vorherige Organpräparation in toto zur histologischen Aufbereitung überführt, so dass eine makroskopische Beurteilung unterblieb.

Das Herz

Die Beurteilung erfolgte makroskopisch und mit Hilfe eines vierfach vergrößernden Operationsmikroskopes, um die Gefäßabgänge in situ zu beurteilen. Zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten BT 12, 18, 19 und 20 wiesen die untersuchten Herzen die spitze herztypische Form auf. Es waren deutlich beide Herzkammern zu unterscheiden, wobei die linke Herzkammer strukturkonform die Herzspitze bildete. Die Gefäßabgänge des Herzen, die bei der Draufsicht auf den eröffneten Hühnerfetus zu erkennen waren, sind die Aa. brachiocephalica dextra und sinistra, die Aorta ascendens und die A. pulmonalis sinistra. Alle überlebenden Tiere der Versuchsgruppen und auch die Kontrolltiere wiesen keine anormalen Befunde auf.

Die Leber

Die Leber der untersuchten Tiere füllte bei Eröffnung des Fetus einen großen Teil des Bauchraumes aus. Die Leber der ozonierten Tiere und der Kontrolltiere erschien stets kompakt, glatt mit scharfen Rändern und wies Färbungen von grün über braun bis ocker-gelb auf. Die grüne Färbung wurde vor allem bei den am BT 12 untersuchten Tieren gefunden, während die ocker-gelbe Färbung erst zu späteren Entwicklungszeitpunkten der BT 18, 19 und 20 vorherrschte. Das einzige überlebende Tier des Versuchs 1,8%/17h am BT 19, das einer Ozonbegasung unterworfen war, wies eine deutliche Grünfärbung der ansonsten befundlosen Leber auf.

Die Milz

Die Milz erschien stets als kleines kugelförmiges Gebilde, das eine glatte Oberfläche und eine blassrosa bis rote Färbung besaß. Makroskopisch traten keine Unterschiede zwischen ozonierten Tieren und Kontrollen auf.

Die Niere

Die Niere war am BT 12 als längliche und am BT 18,19 oder 20 als deutlich dreigeteilte längliche Struktur rechts und links symmetrisch an der Wirbelsäule zu finden. Bei der Entnahme erschien das Organ wenig kompakt und war sehr eng mit der Körperwand der Fossa renalis verbunden, was die Präparation sehr erschwerte bzw. eine vollständige Entnahme ohne Beschädigung der Organstruktur unmöglich werden ließ. In allen Fällen wies sie eine weißlich bis grau-braune Färbung auf.

4.1.4.2 Mikroskopische Beurteilung der Organentwicklung

Der Embryo am BT 6

Der Keimling am BT 6 erscheint stark gekrümmt, der Kopf und die Schnabelanlage waren auf den Thorax gerichtet. Die Organanlagen sind im Längsschnitt durch ihre relative Lage und ihre Struktur eindeutig identifizierbar (Abb. 17). Das Herz (H) und die Leber (L) sind prominent im Brust-Bauch-Raum. Die Urniere (U) erstreckt sich über dreiviertel der gesamten Körperhöhle.

Das Herz

Ein struktureller Unterschied der Herzentwicklung zwischen den Kontrolltieren und den ozonierten Tieren konnte in keinem Versuch festgestellt werden. Entwicklungsmorphologische Unterschiede wiesen die Herzen nur in Abhängigkeit vom untersuchten Alter auf. Die Struktur des Myokards am BT 6 ist deutlich trabekulär mit einer von der Herzperipherie zum Herzzentrum verlaufenden radiären Ausrichtung der juvenilen Kardiomyozyten. Eine typische Dreischichtung in Epikard, Myokard und Endokard ist in dieser Phase der Embryonalentwicklung nur ansatzweise zu erkennen (Abb. 18). Einzig das Epikard ließ eine Zweischichtung in Form des einschichtigen, abgeplatteten Epithels (Serosaepithel) des viszeralen Blattes der unpaaren Perikardhöhle und des darunter befindlichen subepikardialen Mesenchyms erkennen (Abb. 19).

Die Herzen am BT 12 weisen bereits verschiedene Muskelzelllagen auf, die durch die unterschiedlichen Verläufe der Kardiomyozyten sichtbar werden (Abb. 20 und 21). Die beiden Herzkammern sind noch annähernd gleich groß, wobei die linke Myokardwand wesentlich kompakter und weiter entwickelt erschien. Die rechte Myokardwand war durch die charakteristische trabekuläre Architektur der juvenilen Kardiomyozyten geprägt (Abb. 22). Die Kardiomyozyten wiesen eine runde Form auf und waren euchromatinreich (Abb. 21 und 22). Eine geordnete Struktur der kontraktilen Elemente in Form der Querstreifung ließ sich zum BT 12 noch nicht feststellen (Abb. 22).

Die Herzen am BT 18, 19 oder 20 dagegen wiesen bereits eine Querstreifung und Disci intercalares auf (Abb. 25). Die Struktur der Muskulatur erscheint ausgereift. Der Wandaufbau beider Ventrikelwände ist kompakt, trabekuläre Strukturen sind nicht mehr erkennbar. Es zeigt sich eine Dreischichtung mit zwei längs verlaufenden Muskelschichten subendokardial und subepikardial und

dazwischen eine Schicht mit quer laufenden Fasern (Abb. 23 und 24). Die Breite des Myokards ist links größer als rechts. Auch das Lumen der linken Kammer ist deutlich größer als das der rechten. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten (BT 12 und BT 18 oder 19 oder 20) war das Herz vollständig septiert und es konnten vier Kammern abgegrenzt werden. Vereinzelt konnten Lymphozytenansammlungen in der Herzkammer beobachtet werden (Abb. 26), aber gleichermaßen in den Kontrollen und den ozonierten Tieren.

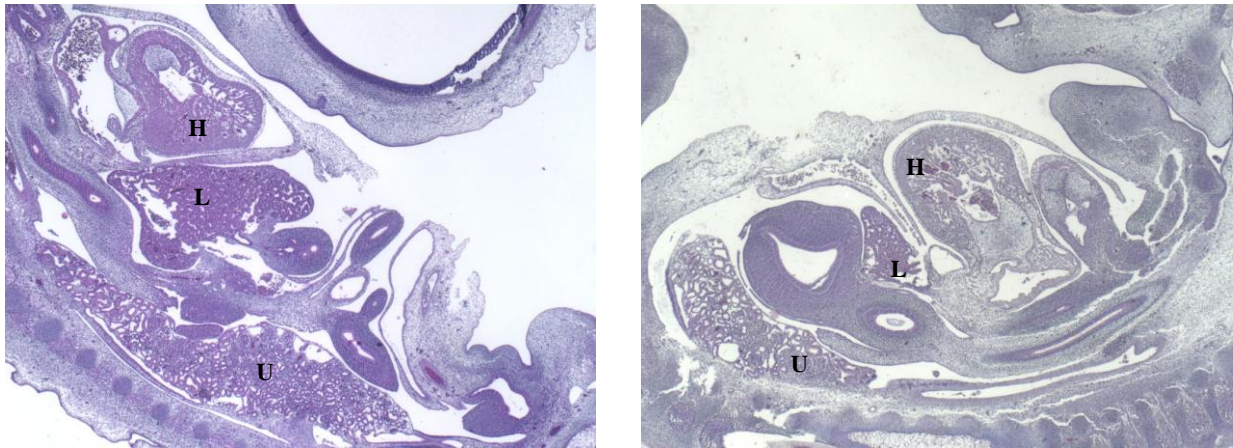


Abb. 17: Vergleichende Darstellung eines Embryos am BT 6 im Längsschnitt. Links ein Kontrolltier, rechts ein ozoniertes Tier. Die Organanlagen für Herz (H), Leber (L) und Urniere (U) sind erkennbar

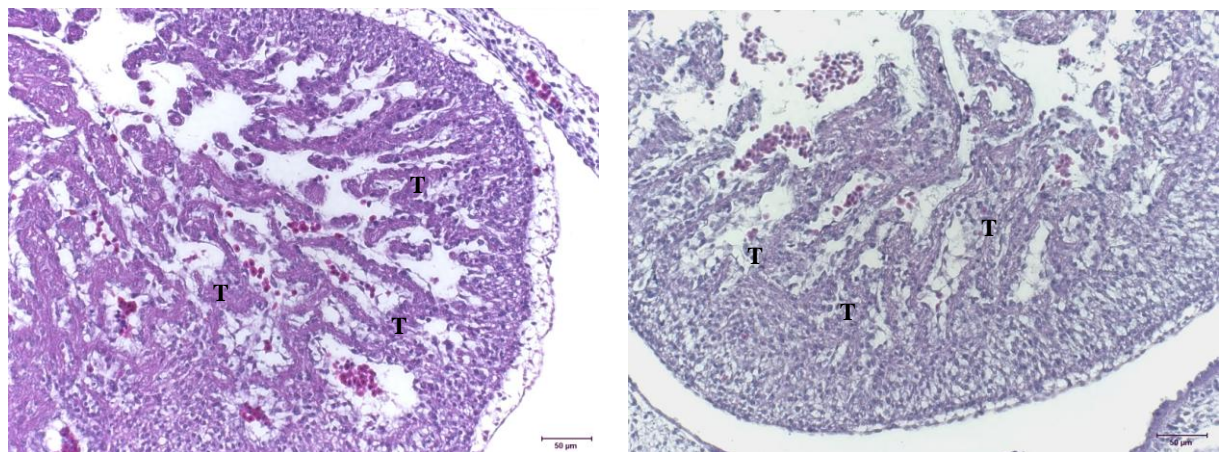


Abb. 18: Embryonales Herz am BT 6, links das eines Kontrolltieres rechts ein ozoniertes Tier. Deutlich ist die trabekuläre Struktur (T) der Herzwand erkennbar.

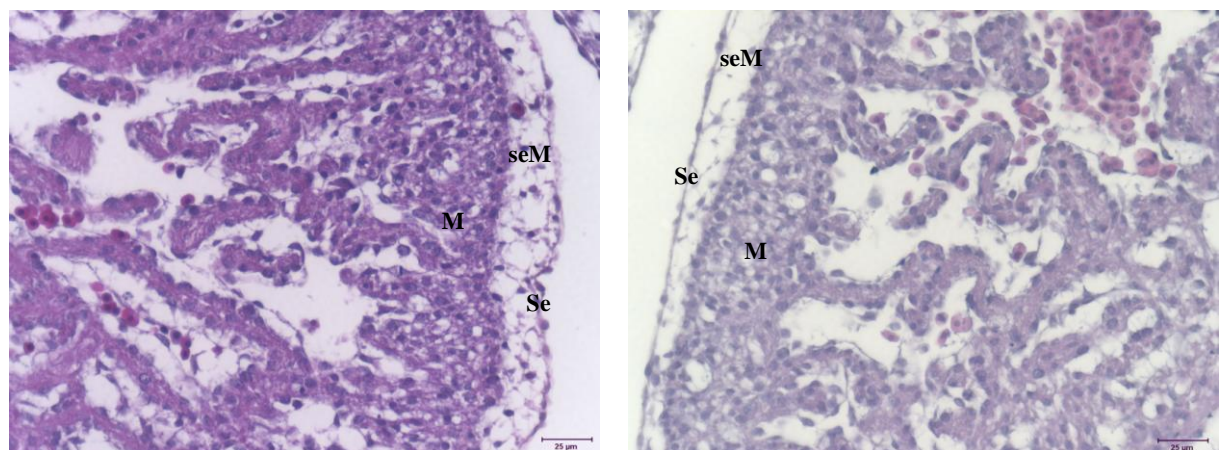


Abb. 19: Am BT 6 sind sowohl beim Kontrolltier (links) als auch beim ozonierten Tier (rechts) das Serosaepithel (Se), das subepikardiale Mesenchym (seM) und das Myokard (M) darstellbar.

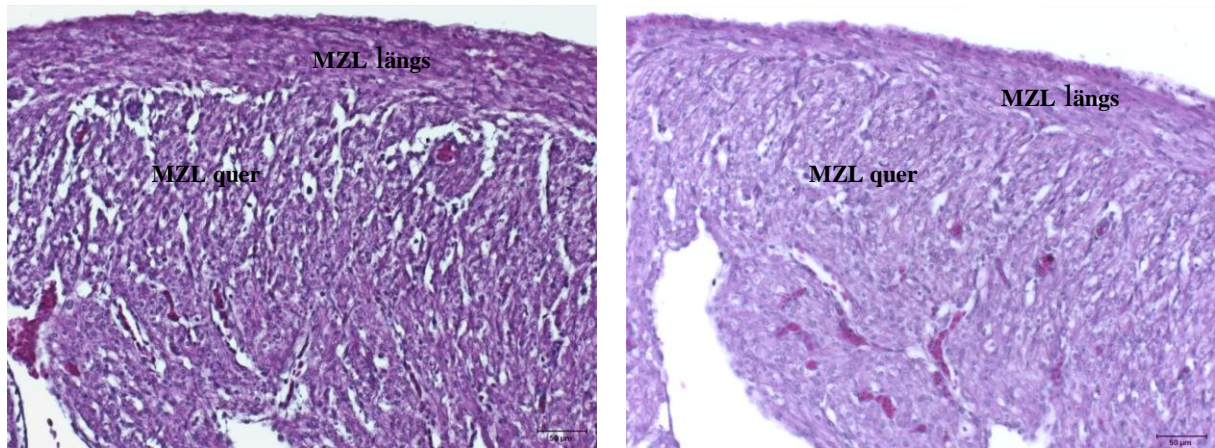


Abb. 20: Darstellung der Herzwand am BT 12 eines Kontrolltieres (links) und eines ozonierten Tieres (rechts). Unterschiedlich orientierte Muskelzelllagen (MZL) waren zu erkennen.

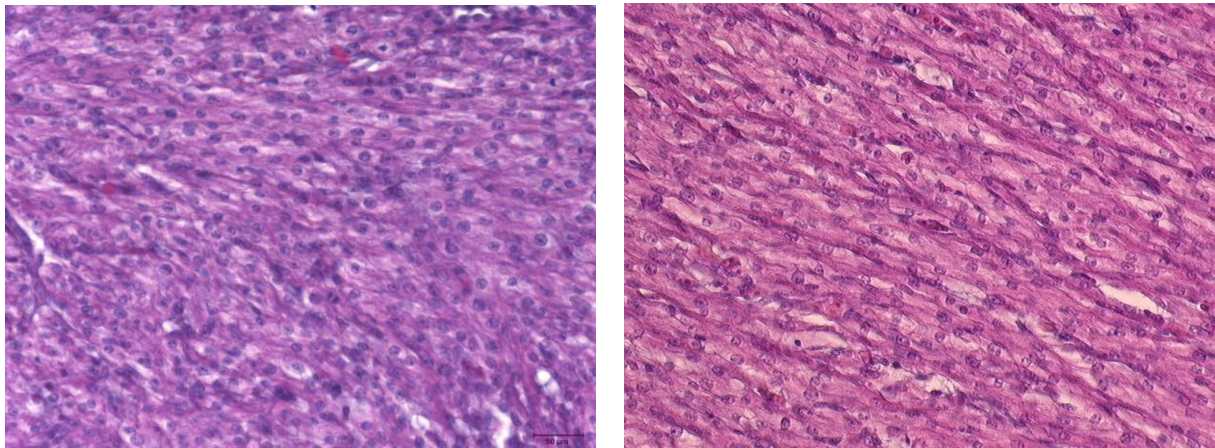


Abb. 21: Die Zellkerne erschienen am BT 12 sowohl bei dem Kontrolltier (links) als auch bei dem ozonierten Tier noch rund und euchromatinreich. Eine unterschiedliche Ausrichtung der Fasern war bereits zu erkennen.

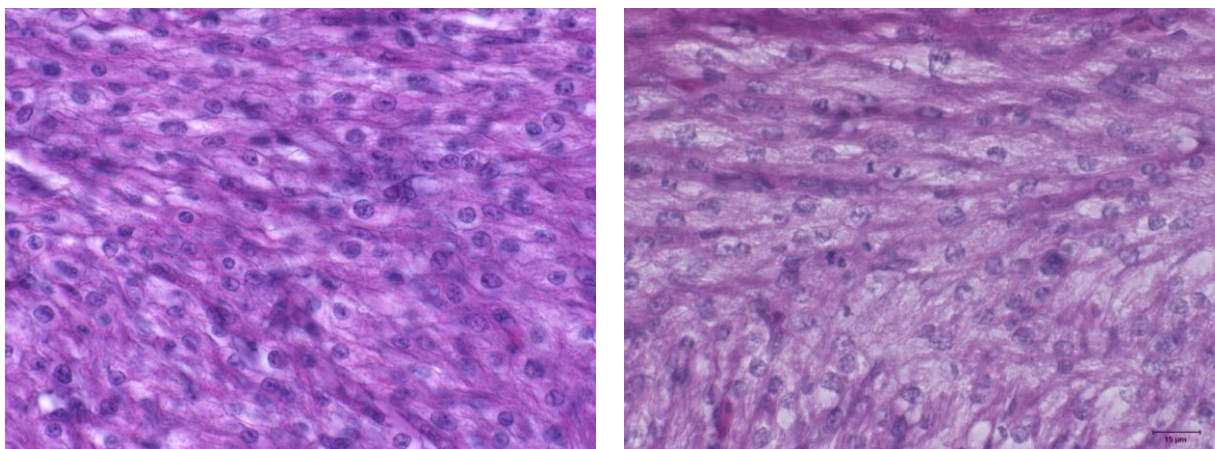


Abb. 22: Eine Querstreifung der Herzmuskelfasern war am BT 12 sowohl beim Kontrolltier (links) als auch beim ozonierten Tier (rechts) noch nicht zu erkennen. Besonders gut waren die runden euchromatinreichen Zellkerne der Kardiomyozyten erkennbar.

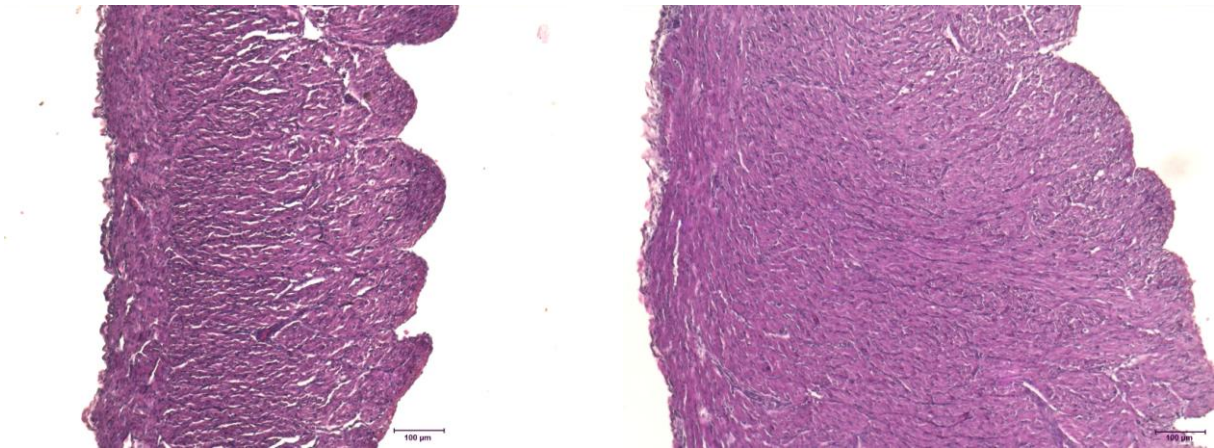


Abb. 23: Die rechte Herzwand eines Kontrolltieres (links) und die linke eines ozonierten Tieres (rechts) am BT 19. Sie erschienen kompakt und es waren unterschiedliche Faserverläufe sichtbar. Deutlich war die unterschiedliche Dicke zu erkennen.

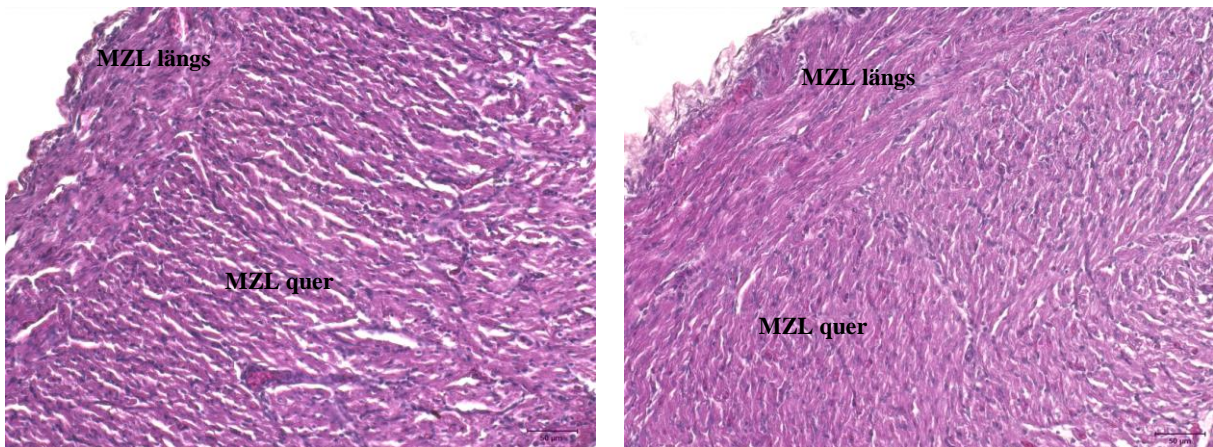


Abb. 24: Deutliche Sichtbarkeit der unterschiedlichen Ausrichtung der Muskelzelllagen (MZL) vergleichend bei einem Kontrolltier (links) und einem ozonierten Tier am BT 19.

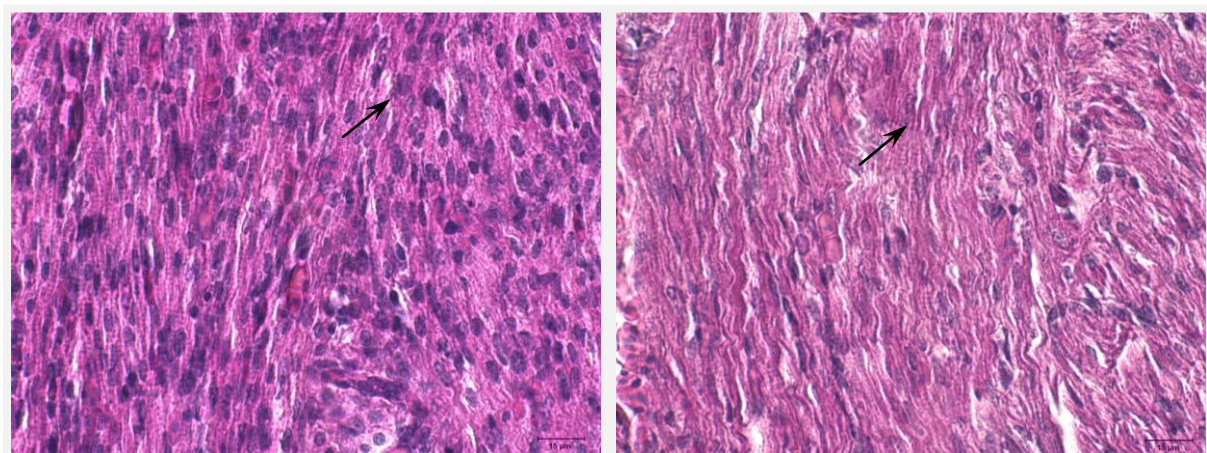


Abb. 25: Die Querstreifung der Herzmuskulatur war sowohl bei dem Kontrolltier (links) als auch bei dem ozonierten Tier (rechts) deutlich zu erkennen. Die Zellkerne erschienen oval und die Fasern dicht gepackt. Die Ausbildung der Glanzstreifen, Disci intercalares (schwarze Pfeile), war für beide Gruppen nachweisbar.

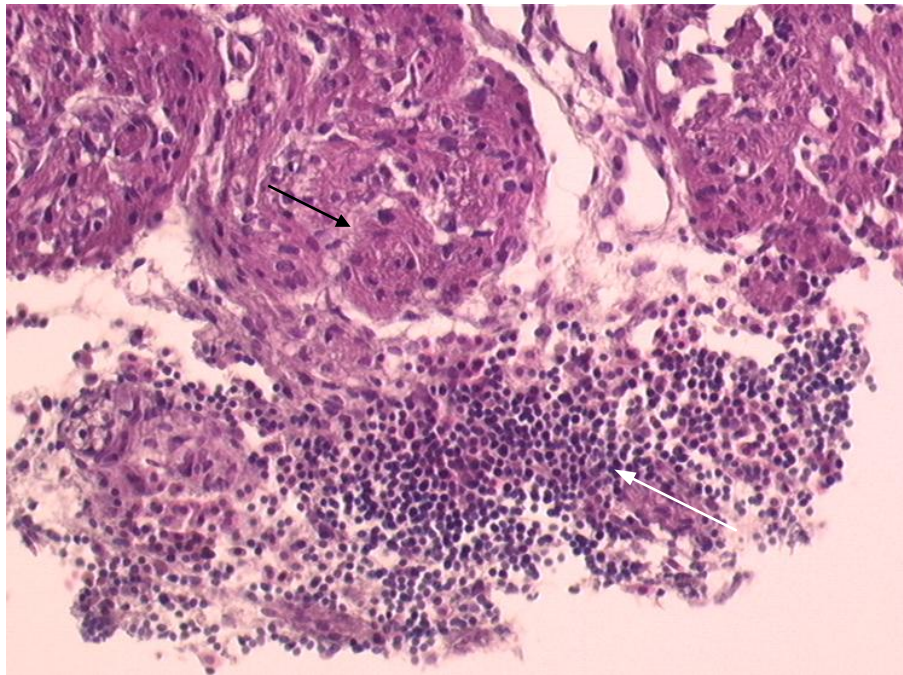


Abb. 26: Eine deutliche Lymphozytenansammlung (weißer Pfeil) links oder rechts im Ventrikellumen eines Kontrolltieres am BT 19.

Die Leber

Am BT 6 und 12 erschien das Gewebe der Leber noch wenig kompakt, die Lebersinusoiden waren sehr weitlumig. Die Formierung zu Zellsträngen war bereits sichtbar (Abb. 27 und Abb. 28). Dagegen wiesen die zum späteren Zeitpunkt entnommenen Organe eine kompaktere Gewebestruktur auf. Die Lebersinusoiden sind sehr englumig und es sind vermehrt verzweigte Zellstränge sichtbar (Abb. 29). Die durchweg bei allen Tieren beider Gruppen untersuchten Lebern waren befundlos, nur beim Versuch 1,8%/17h zeigte sich in der Leber eine deutliche Gallengangstauung (Abb. 30). Die beschriebenen strukturellen Veränderungen waren nur auf Grund der unterschiedlichen Entnahmezeitpunkte festzustellen, nicht jedoch zwischen den Kontrollen und den Versuchstieren.

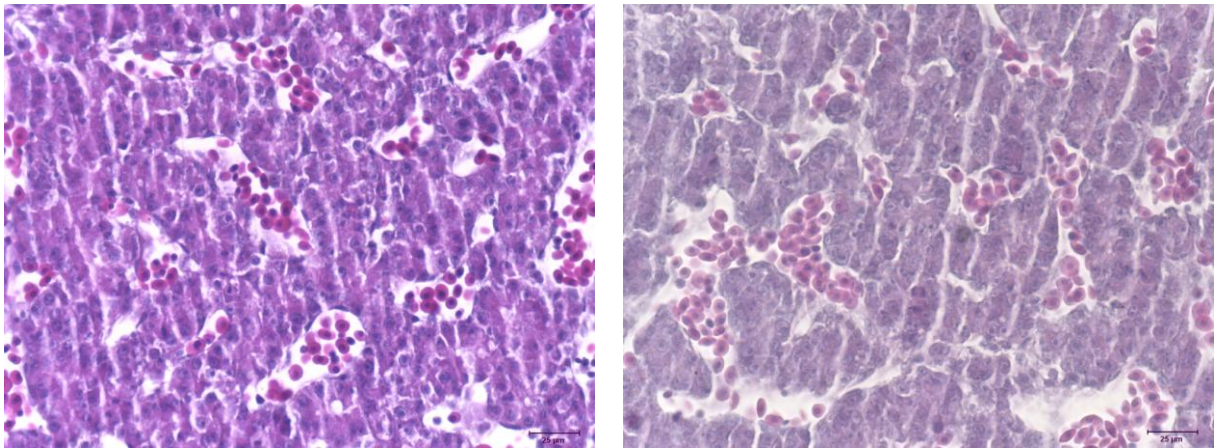


Abb. 27: Die Leberstruktur am BT 6 vergleichend bei einem Kontrolltier (links) und einem ozonierten Tier (rechts) zeigte bei beiden noch große mit Erythrozyten gefüllte Lebersinusoiden und die verzweigte Zellstrangbildung.

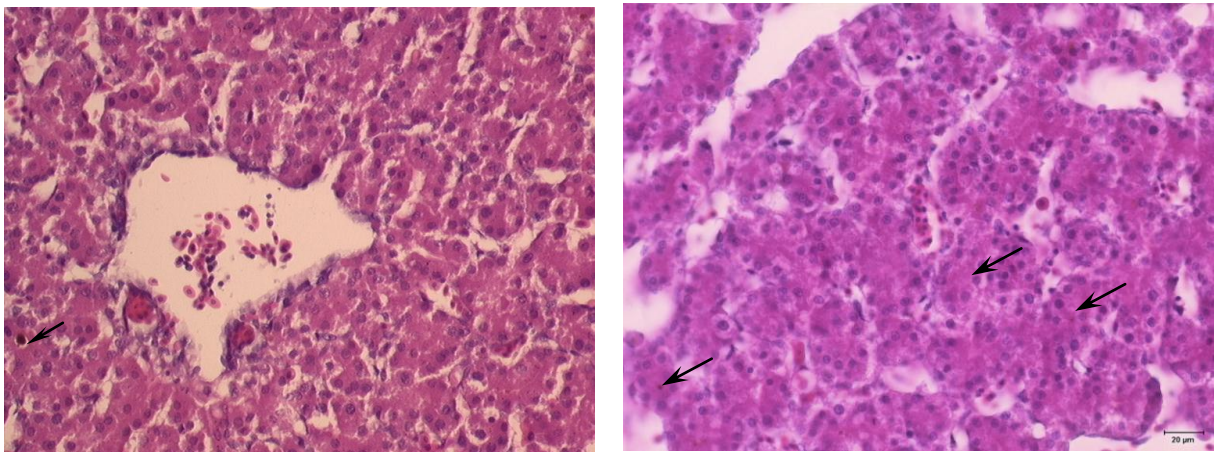


Abb. 28: Die Leber am BT 12 vergleichend bei einem Kontrolltier (links) und einem ozonierten Tier (rechts) zeigte eine kompakter Struktur und deutlichere Zellstrangbildung als noch am BT 6. Die teilweise quer angeschnittenen Stränge zeigen das zentral gelegene Gallenkanälchen mit den sich darum formierenden Hepatozyten (schwarzer Pfeil).

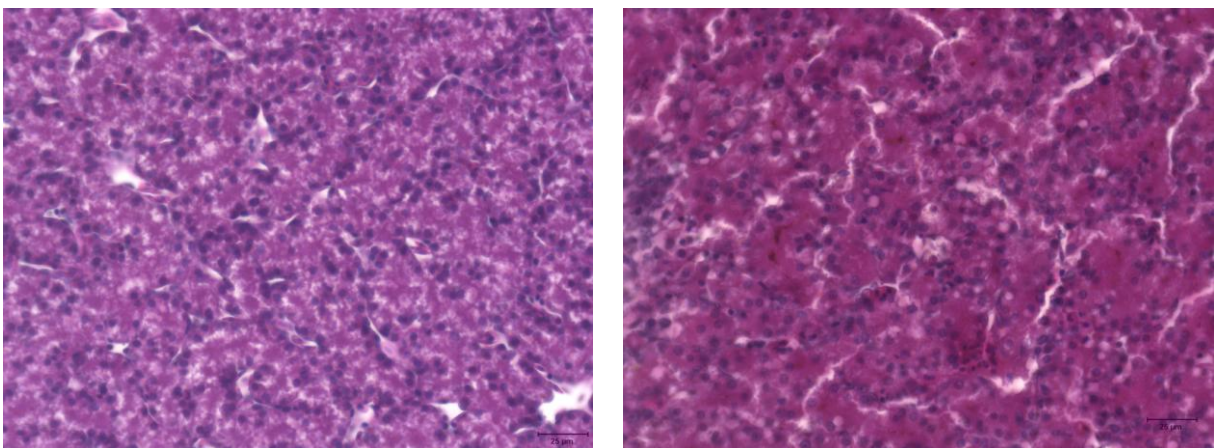


Abb. 29: Die Leberstruktur am BT 18 vergleichend bei einem Kontrolltier (links) und einem ozonierten Tier (rechts) zeigte eine dichte Lagerung der verzweigten Zellstränge, die Lebersinusoiden waren eng.

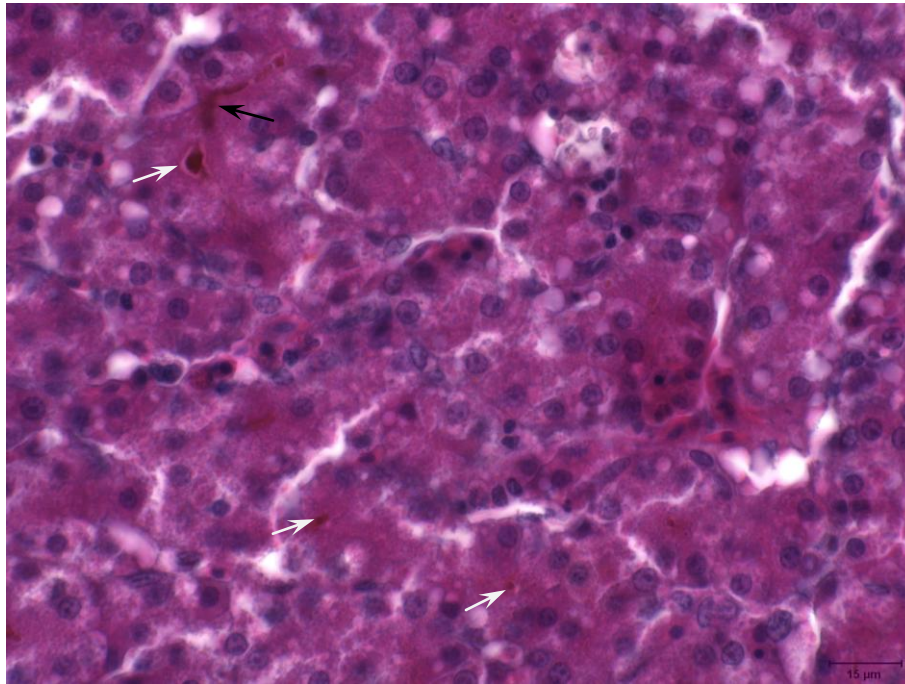


Abb. 30: Die Leber eines ozonierten Tieres zeigte am BT 18 eine deutliche Stauung in den Gallenkanälchen, sowohl im Querschnitt (weiße Pfeile) als auch im Längsschnitt (schwarzer Pfeil).

Die Milz

Eine histologische Beurteilung der Milz fand aus technischen Gründen nur bei der Entnahme am BT 18, BT 19 oder BT 20 statt, da die am BT 12 entnommenen Proben bei der Aufbereitung auf Grund ihres Größenverlusts bei der Entwässerung durch die Öffnungen der Einbettkassetten verloren gingen. Die vergleichende Untersuchung an den BT 18, 19 oder 20 nach Begasung mit Ozon unterschiedlicher Konzentrationen und ohne Begasung erbrachte keine Unterschiede auf der strukturellen Ebene. Die Milz war in allen Fällen von einer Kapsel (Abb. 31) umgeben, die aus mehreren Lagen Bindegewebszellen bestand. Die rote Milzpulpa in Form der mit Erythrozyten gefüllten Sinusoide und der Pulpastränge und die weiße Milzpulpa mit den Milzfollikeln waren nicht sehr deutlich voneinander zu unterscheiden (Abb. 32, Abb. 33, Abb. 34). In verschiedenen Anschnitten waren deutlich die die Milz unvollständig untergliedernden bindegewebigen Stränge, die sogenannten Trabekel, sichtbar (Abb. 31).

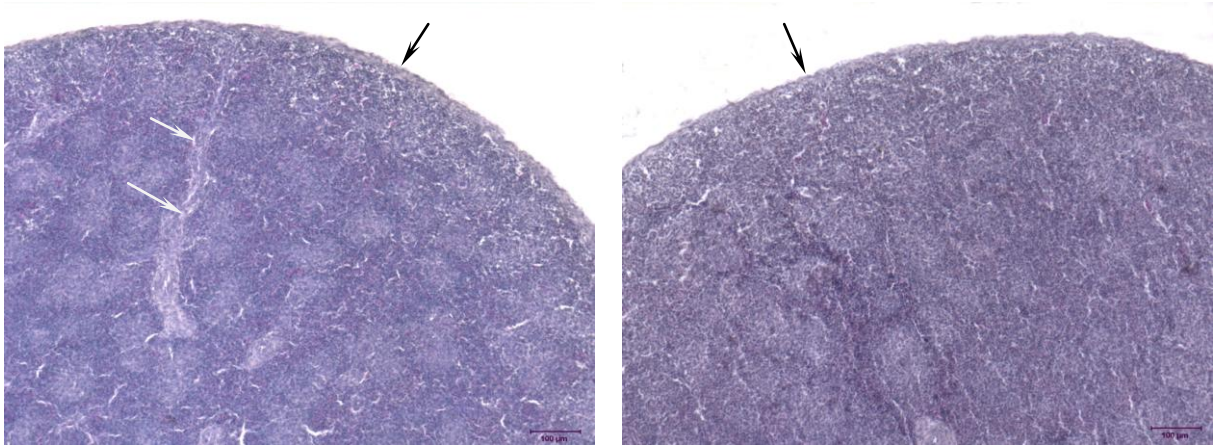


Abb. 31: Vergleichende Darstellung der Milz eines Kontrolltieres (links) und eines ozonierten Tieres am BT 18. Die Milz ist überzogen von einer Kapsel (schwarze Pfeile). Die Formierung der weißen und roten Milzpulpa ist sichtbar. In der rechten Abbildung ist ein aus Bindegewebe bestehender Trabekel sichtbar (weiße Pfeile).

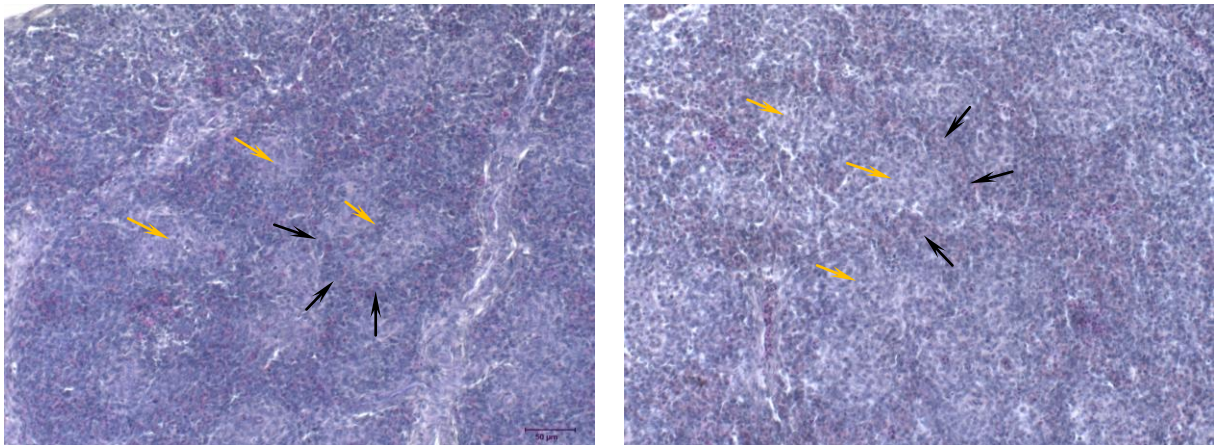


Abb. 32: Die rote Milzpulpa (schwarze Pfeile) und die weiße Milzpulpa (gelbe Pfeile) sind sowohl beim Kontrolltier (links) als auch beim ozonierten Tier (rechts) nicht deutlich unterscheidbar.

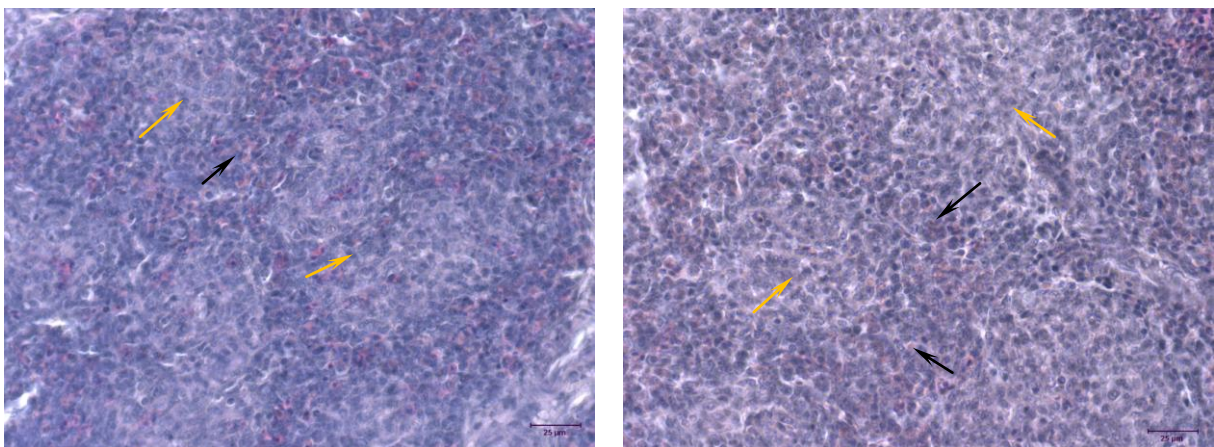


Abb. 33: Die rote Milzpulpa (schwarze Pfeile) mit nur sehr undeutlichem Übergang zu den Milzknötchen (gelbe Pfeile) beim Kontrolltier (links) und beim ozonierten Tier (rechts).

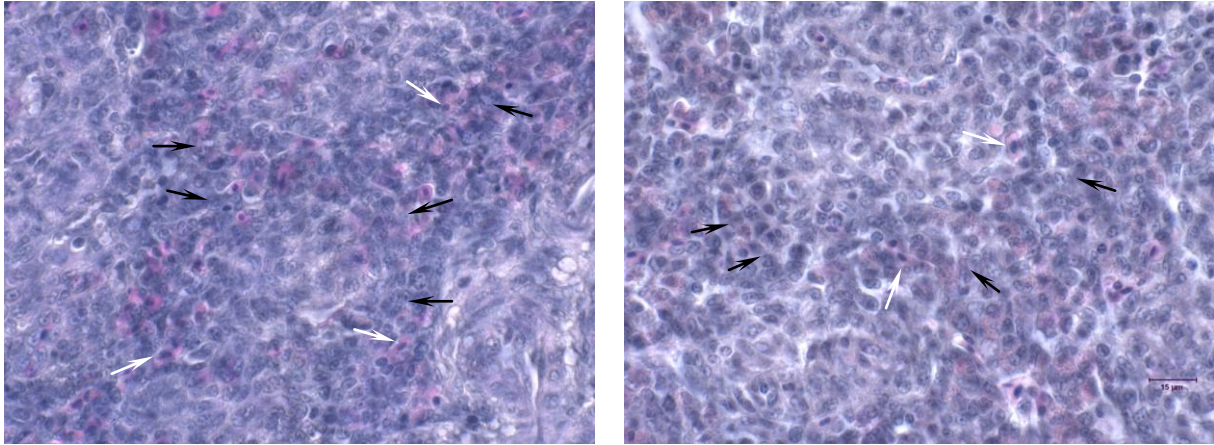


Abb. 34: In der roten Milzpulpa (schwarze Pfeile) waren sowohl beim Kontrolltier (links) als auch beim ozonierten Tier (rechts) die kernhaltigen Erythrozyten erkennbar

Die Niere

Die Niere wirkte, wie schon makroskopisch, auch mikroskopisch wenig kompakt. Eine Kapsel war nicht darstellbar. Am BT 6 (Abb. 35 und Abb. 36) sind an der Urniere sowohl bei den Kontrollen als auch bei den ozonierten Tieren regelkonform entwickelte Urnierenkörperchen und Urnierenkanälchen erkennbar. An der Nachniere am BT 12 und BT 18, 19 oder 20 (keine Abbildungen) konnten die charakteristische Strukturen Bowmansche Kapsel, Glomerulum und Sammelrohrsystem identifiziert werden, ohne dass ein struktureller Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und den Kontrollen festgestellt werden konnte. Die Nierenkörperchen erschienen überwiegend rund und das zentral liegende Kapillarknäul war durch einen Spalt getrennt von der Bowmanschen Kapsel. Dieser Spalt war teils halbmondförmig, teils das gesamte Knäul bis auf einen Pol umfassend sichtbar.

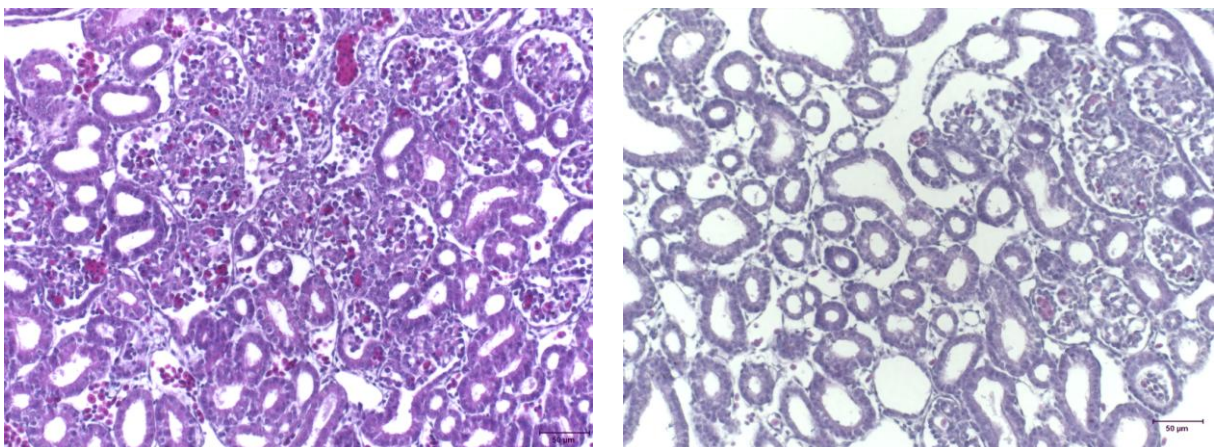


Abb. 35: Die vergleichende Darstellung der Urniere am BT 6 eines Kontrolltieres (links) und eines ozonierten Tieres (rechts) zeigte eine wenig kompakte Struktur, die bei dem ozonierten Tier deutlicher war.

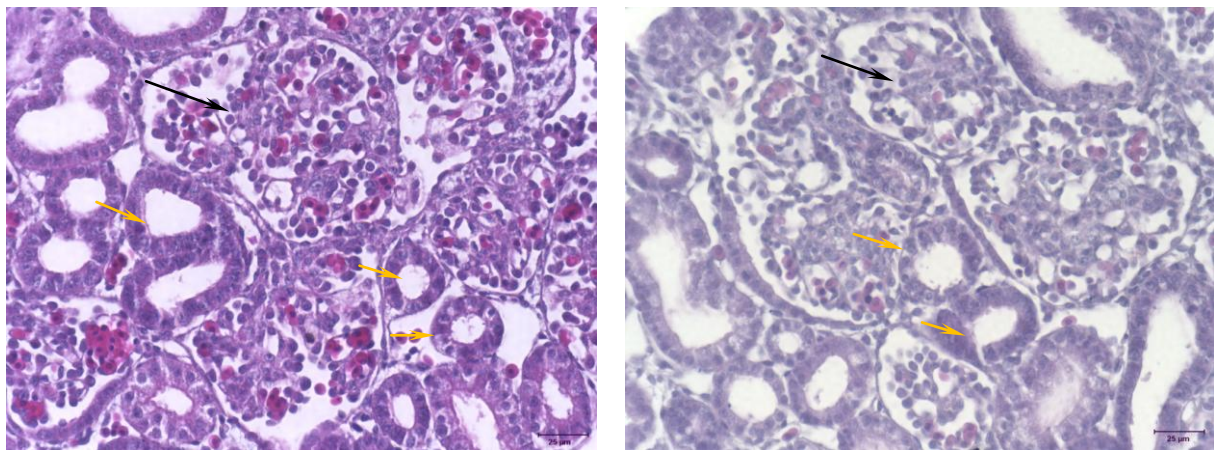


Abb. 36: Bereits an der Urniere am BT 6 ließen sich sowohl beim Kontrolltier (links) als auch beim ozonierten Tier (rechts) Urnierenkörperchen (schwarze Pfeile) und Urnierenkanälchen (gelbe Pfeile) unterscheiden.

4.2 Ergebnisse der Begasung am Bruttag 3, 4 oder 5 mit 5%/ 1h EWZ

Um eine erste Einschätzung der Wirkung von Ozon auf ein sich entwickelndes System machen zu können wurde die Applikation während der Organogenese des Hühnerembryos vorgenommen. Nach der Begasung am BT 3, 4 und 5 wurde für die Eier der ersten Versuchsreihe der BT 8 als Entnahmetag gewählt, während dies in der zweiten Versuchsreihe der BT 6 war. Nach der Entnahme der Embryonen erfolgte eine Altersbestimmung, die auch den Absterbezeitpunkt mit einschloss. In beiden Versuchsreihen wurden die Gewichte der lebenden Tiere und darüber hinaus auch die SSL der Embryonen, die am BT 6 entnommen wurden, erhoben.

4.2.1 Auswirkung auf das Überleben und den Zeitpunkt des Absterbens bei der Begasung am Bruttag 3, 4 oder 5

Die Bestimmung des Zeitpunktes des Todes bzw. des Alters der überlebenden Tiere erfolgte mittels laboreigener Referenztiere, den Angaben nach HAMBURGER und HAMILTON (1950) und einer Schautafel von Beryl E. Tolhurst (FREEMAN und VINCE 1974). Die Lebensfähigkeit war anhand der Herzkontraktionen erkennbar.

Die erste Versuchsreihe mit einer Überlebenszeit von acht BT ermöglichte die Verifizierung der Methodik für die zweite Versuchsreihe bei der als ET der BT 6 (ET 6) gewählt wurde. Darüber hinaus wurde im Vorfeld in einer kleineren Studie mit 20 Tieren ohne Begasung bei 10 Tieren eine transkardiale Perfusion durchgeführt. Da die Qualität der gewonnenen Befunde mit Perfusion keine nennenswerten Vorteile gegenüber einer ausbleibenden Perfusion brachten und dies, gegen das mit der Manipulation verbundene Risiko der artifiziellen Schädigung abgewogen wurde, wurde während der zweiten Versuchsreihe (ET 6) auf die Perfusion verzichtet. Die Daten der ersten Versuchsreihe (ET 8) änderten ebenfalls den Entnahmezeitpunkt. Statt der Entnahme der Feten am BT 8 wurde die Untersuchung am BT 6 vorgenommen, da die Längsschnitte der Feten zur Paraffineinbettung an

diesem BT auf Grund der geringeren Größe qualitativ besser waren. Um auszuschließen, dass die Entnahme aus dem Brutapparat, die zur Begasung nötig ist, Einfluss auf die Überlebensrate hat, wurden während der ersten Versuchsreihe (ET 8) für jeden Begasungstag 10 der 20 Kontrolleier während der Ozonierung ebenfalls aus dem Brutapparat entnommen. Die Entnahme, der Transport zur Ozonkammer, die Anflutungszeit bis zum Erreichen der Ozonkonzentration von 5%, die EWZ des Ozons und das Zurücksetzen in den Inkubator benötigten durchschnittlich 1 h und 55 min (Behandlungszeit). Es konnte kein Einfluss auf die Anzahl der lebensfähigen Tiere am BT 8 durch die Entnahme aus dem Inkubator für die Behandlungszeit festgestellt werden (Tab. 4b). Aus diesem Grund wurde während der zweiten Versuchsreihe darauf verzichtet.

Zunächst erfolgte die zeitliche Einordnung des Absterbens bei der Begasung mit 5%/1h EWZ in der ersten Versuchsreihe ET 8 und für die zweite Versuchsreihe mit dem ET 6. Bei der Entnahme am BT 8 (Tab. 4a) in der ersten Versuchsreihe und am BT 6 (Tab. 5) in der zweiten Versuchsreihe erfolgte zunächst die zeitliche Einordnung des Absterbens auf Grund der morphologischen Entwicklung.

Bei der Entnahme der Tiere am BT 8 bzw. BT 6 wurden diese mittels Operationsmikroskops auf morphologisch normale Entwicklung unter Einbeziehung des Zeitpunktes des Absterbens untersucht. Als von der Norm abweichend konnten dabei folgende Befunde erhoben werden: ein Tier der Versuchsgruppe aus PS BT 4 ET 6 zeigte eine verstärkte Vaskularisation der linken Körperhälfte. Ein vergleichbarer Befund konnte auch bei einem Kontrolltier zum Versuch PS BT 4 ET 8 gemacht werden. Eine morphologische Abweichung zeigte ein Tier aus dem Versuch PS BT 5 ET 6 bei der Untersuchung am BT 6 in Form einer doppelten Kopfanlage. Darüber hinaus ergab die Beurteilung der Entwicklung der Tiere nur bei einem Tier der ersten Versuchsreihe PS BT 3 ET 8 das lebend entnommen wurde, eine deutliche Hypo- bzw. Aplasie des Ober- und Unterschnabels. Dieses Tier erschien bereits bei der Entnahme morphologisch deutlich weniger weit entwickelt, im Vergleich zu den Kontrollen und dem zweiten überlebenden Tier dieser Versuchsgruppe. Alle weiteren Tiere, deren Todeszeitpunkt auf Grund der Referenzen bestimmt wurde, wiesen in allen Fällen eine für ihren Entwicklungsstand normale Morphologie auf. Die parallel zu jedem Versuch in den beiden Versuchsreihen mitlaufenden Kontrollen wiesen stets eine Überlebensrate zwischen 90 und 100% auf. Die überlebenden Tiere der Versuchsgruppen zeigten einen kräftigen Herzschlag.

Versuch	Begasungstag		Tieranzahl	tot vor Beg.	tot nach Beg.	lebend am BT8	ÜLR
PS BT 3 ET 8	BT 3	Kontrolle	20 [^]			20	100%
		Ozon	20	2	16	2*	10%
PS BT 4 ET 8	BT 4	Kontrolle	20 [^]			20	100%
		Ozon	20	4	16	0*	0%
PS BT 5 ET 8	BT 5	Kontrolle	20 [^]			18	90%
		Ozon	20	2	18	0*	0%

Tab. 4a: PS BT 3 bis BT 5 ET 8. Zeitliche Einordnung des Absterbens bei der Begasung mit 5% und einer EWZ von einer Stunde am BT 3, BT 4 oder BT 5 und die ÜLR in % am Entnahmetag BT 8. * signifikant bei $p < 0,01$.

[^]10 der Kontrollen wurden während der Begasung ebenfalls aus dem Inkubator entnommen und bei Raumtemperatur gelagert. Nach Beendigung der Behandlung erfolgte das zeitgleiche Zurücksetzen dieser Kontrollen und der ozonierten Eier in den Inkubator.

	Anzahl	überlebend bis BT 8	ULR in%
Unterbrechung der Bebrütung für 115 min und Lagerung bei Raumtemperatur	30	30	100%
keine Unterbrechung der Bebrütung	30	28	93,3%

Tab. 4b: Vergleich der am BT 8 lebensfähigen Kontrolltiere, die während der Behandlungszeit der zu ozonierenden Eier bei Raumtemperatur gelagert wurden, mit denen die im Inkubator verblieben. Es zeigt sich kein Einfluss durch die Entnahme auf die Lebensfähigkeit.

Versuch	Begasungstag		Tieranzahl	tot vor Beg.	tot nach Beg.	lebend am BT6	ÜLR
PS BT 3 ET 6	BT 3	Kontrolle	10			10	100%
		Ozon	30	8	20	2*	7%
PS BT 4 ET 6	BT 4	Kontrolle	10			10	100%
		Ozon	30	6	23	1*	3%
PS BT 5 ET 6	BT 5	Kontrolle	10			10	100%
		Ozon	30	2	28	0*	0%

Tab. 5: PS BT 3 bis BT 5 ET 6. Zeitliche Einordnung des Absterbens bei der Begasung mit 5% /1h am BT 3, BT 4 oder BT 5 und die ÜLR in % am Entnahmetag BT 6 im Vergleich mit den Kontrolltieren. * signifikant bei $p < 0,01$

Die Begasung an den jeweiligen Brutttagen hat einen starken Einfluss auf die Anzahl der überlebenden Tiere (Tab 4 und Tab. 5). So überlebten bei der Begasung am BT 3 nur jeweils zwei Tiere bis zum BT 6 und BT 8, die Begasung am BT 4 zeigte kein (ET 8) bzw. nur ein (ET 6) überlebendes Tier, während die Begasung am BT 5 in beiden Versuchsreihen zum Tod aller Feten führte. Die Tiere, die nicht den Entwicklungsstand des Ozonierungstages erreichten, wurden als tot vor Begasung eingestuft. In beiden Versuchen wird deutlich, dass der überwiegende Anteil der Embryonen den normalen Entwicklungsstand bis zur Begasung erreichte und dann abstarb (tot nach Begasung). Einen Unterschied der ÜLR in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt konnte nicht nachgewiesen werden. Von den Tieren, die während der ersten Versuchsreihe den Begasungstag erreichten, starben am BT 3 16 der 18 Tiere, am BT 4 16 von 16 Tiere und am BT 5 18 der 18 ozonierten Tiere (Abb. 37). Für die zweite Versuchsreihe ergaben sich vergleichbare Zahlen. Am BT 3 starben nach der Begasung 20 der 22 Tiere ab, die diesen Entwicklungsstand erreichten, nach der Begasung am BT 4 und BT 5 jeweils die gesamte Anzahl der Embryonen, die diesen Stand erreichten (Abb. 38).

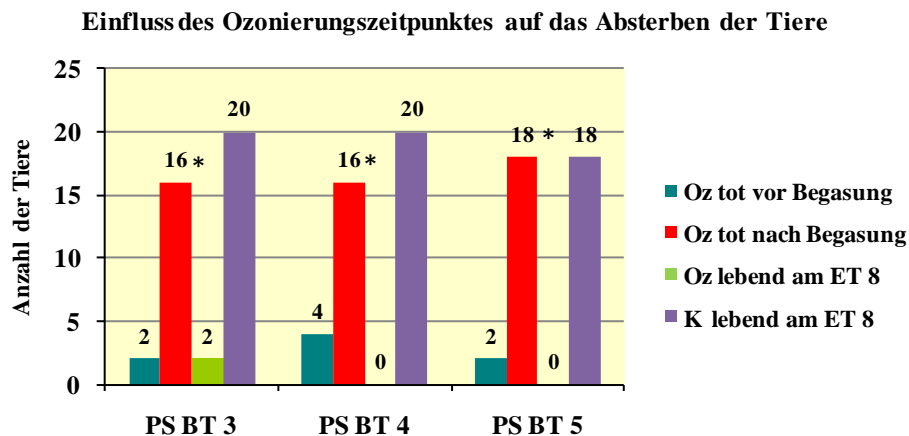


Abb. 37: Der Zeitpunkt des Absterbens der ozonierten Tiere der ersten Versuchsreihe **PS BT 3-5 ET 8** zeigte eine deutliche Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Begasung. Einen Unterschied zwischen den Begasungstagen konnte jedoch nicht festgestellt werden. * signifikant bei $p < 0,01$.

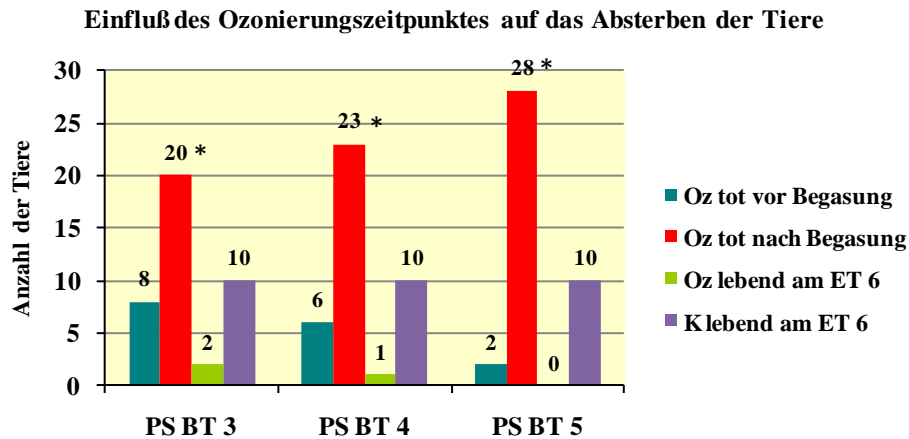


Abb. 38: Der erreichte Entwicklungsstand der Tiere bis zu ihrem Absterben zeigte bei der zweiten Versuchsreihe **PS BT 3-5 ET 6** eine deutliche Abhängigkeit vom Ozonierungszeitpunkt. Eine Abweichung zwischen den BT an denen begast wurde gab es nicht. * signifikant bei $p < 0,01$.

4.2.2 Auswirkungen auf die Gewichts- und Längenentwicklung

Für den Versuch PS BT 3 ET 8 wurde bei den beiden überlebenden Tieren nur das Gewicht bestimmt. Da bei den anderen beiden Versuchen PS BT 4 und BT 5 keine Tiere bis zum ET 8 überlebten, konnten keine Daten ermittelt werden. Der Mittelwerte der Gewichte der beiden bis zum ET 8 überlebenden Tiere liegt mit 0,74g signifikant unter dem der Kontrollen mit 1,14g ($p=0,002$) (Abb. 39).

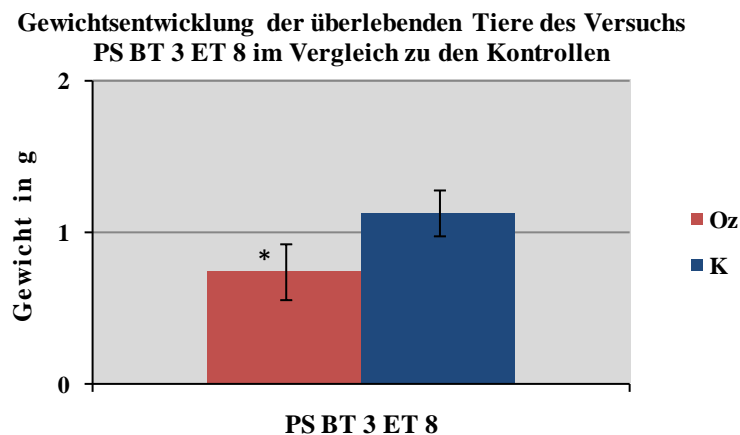


Abb. 39: Der Mittelwert der Gewichte der beiden überlebenden Tiere des Versuchs **PS BT 3 ET 8** blieb im Vergleich signifikant ($p=0,002$) unter dem der Kontrollen. * signifikant bei $p < 0,05$.

Betrachtet man in der zweiten Versuchsreihe die Mittelwerte der Gewichts- und Längenentwicklung im Vergleich zu den Kontrollen, so weisen die überlebenden Tiere des Versuchs PS BT 3 ET 6 mit 0,28 g und 3,5 cm im Vergleich zu den Kontrollen mit 0,4 g und 4,2 cm eine signifikant geringere Gewichts- ($p=0,032$) und Längenentwicklung ($p=0,025$) auf (Abb. 40 und Abb. 41). Die Parameter des überlebenden Tieres des Versuchs PS BT 4 ET 6, lagen leicht über dem jeweiligem Mittelwert der Kontrollen. Da nach der Begasung am BT 5 kein Tier bis zum ET 6 überlebte, wurden hier keine Daten erhoben.

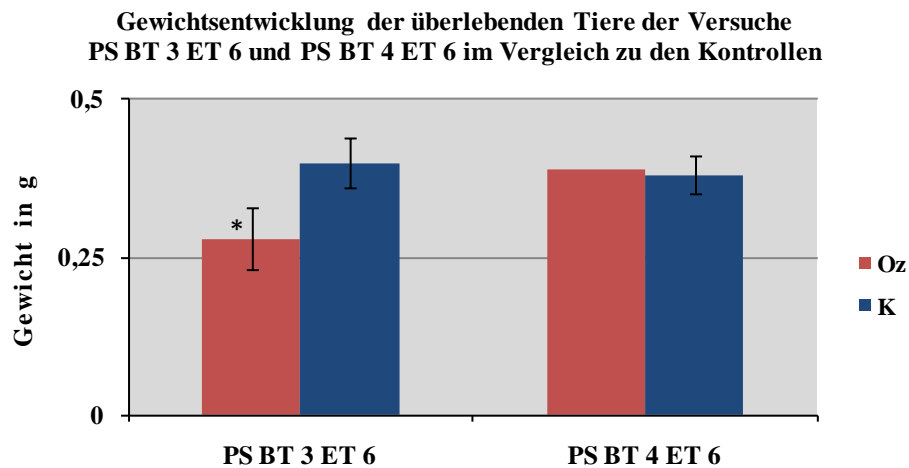


Abb. 40: Der Mittelwerte der Gewichte der überlebenden Tiere des Versuchs **PS BT 3 ET 6** war signifikant ($p=0,032$) geringer im Vergleich zu den Kontrollen und auch das überlebende Tier des Versuchs **PS BT 4 ET 6** lag unter dem Mittelwert der Kontrollen. * signifikant bei $p < 0,05$.

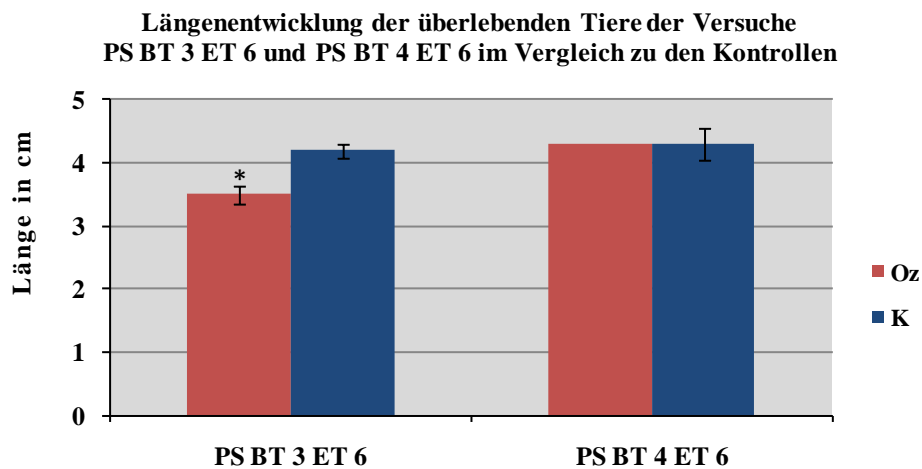


Abb. 41: Der Mittelwerte der Länge der überlebenden Tiere des Versuchs **PS BT 3 ET 6** war signifikant geringer ($p=0,025$) im Vergleich zu den Kontrollen, das überlebende Tier des Versuchs **PS BT 4 ET 6** war mit 4,3 cm genauso groß wie der Mittelwert der Kontrollen. * signifikant bei $p < 0,05$.

4.2.3 Ergebnisse der licht- und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen

4.2.3.1 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung

Die Befunderhebung an den lichtmikroskopisch untersuchten Präparaten der zweiten Versuchsreihe erfolgte ausschließlich an den Organen Herz, Leber und Niere. So sollte ein potentieller Einfluss des applizierten Ozons innerhalb des kritischen Zeitfensters der Embryonalentwicklung des Hühnchens dokumentiert werden.

Die Untersuchung der **Herzentwicklung** der Kontrolltiere und des überlebenden Tieres, das am BT 3 begast wurde, konnte am BT 6 die deutliche Trabekelbildung und die Septierung der Herzkammer nachweisen. Ein Serosaepithel, das subepikardiale Mesenchym und das Myokard waren zu identifizieren. Tiere, die unmittelbar nach der Begasung am BT 3 abgestorben sind, zeigten lediglich eine beginnende Trabekelformation. Die Ergebnisse der Untersuchung des überlebenden Tieres nach der Begasung am BT 4 sind vergleichbar mit den bereits genannten des Begasungsversuches am BT 3. Das Herz der Tiere dieser Versuchsreihe ließen lediglich eine deutlichere Trabekelstruktur erkennbar werden im Vergleich zu den am BT 3 verstorbenen Tieren. Die Schichtung wird bei den Tieren, die am BT 5 nach der Begasung verstorben sind, noch deutlicher. So ließen sich ein Epikard, bestehend aus dem Serosaepithel und dem subepikardialen Mesenchym, und eine deutliche Myokardstruktur mit Trabekelbildung nachweisen. Diese Befunde waren vergleichbar mit denen der Kontrollen.

Die Untersuchung der **Leber** der überlebenden Tiere der Versuchsreihe PS BT 3 ET 6 erbrachten vergleichbare Befunde zu denen ihrer Kontrollen. Die Sinus waren noch sehr weit, mit kernhaltigen Erythrozyten gefüllt und Zellstrangformationen waren sichtbar. Die Beurteilung der Leberentwicklung bei den Tieren, die kurz nach der Begasung am BT 3 verstorben sind, erwies sich auf Grund des sehr frühen Entwicklungsstadiums, in dem sich die Leber zu diesem Zeitpunkt befindet als sehr schwierig. So konnte nur teilweise eindeutig die Leberanlage identifiziert werden. Auch bei den nach der Begasung am BT 4 verstorbenen Tieren war die Beurteilung der Leber nur bei einzelnen Tieren möglich. Es zeigte sich eine beginnende Formierung von Zellsträngen, die entstehenden Sinus erscheinen noch weiter als die der Kontrollen, die jedoch erst am BT 6 untersucht wurden. Die untersuchte Leber des Versuchs PS BT 4 ET 6 zeigte wie auch die Kontrolltiere eine deutliche verzweigte Zellstrangbildung der Hepatozyten mit dazwischenliegenden Lebersinusoiden und es ließen sich Gallenkanälchen identifizieren. Die unmittelbar nach der Begasung am BT 5 verstorbenen Tiere ließen wie die des Versuchs PS BT 4 nur eine beginnende Formierung der Balkenstruktur erkennen mit ebenfalls weit erscheinenden Sinus.

Die **Niere** mit den funktionellen Strukturen Glomerulum, Bowmansche Kapsel und Nierenkanälchen konnten zu allen angegebenen Untersuchungszeitpunkten gefunden werden. Sie liegt als sehr großes Organ ventral der sich bildenden Wirbelsäule an. Zum Teil gelang auch der Nachweis des parallelen Vorliegens zweier Nierenstrukturen – der Ur- und der Nachniere. Dies war vor allem bei den Tieren,

die nach der Begasung am BT 5 verstorben sind und bei den Kontrollen sowie den überlebenden Tieren der Fall.

4.2.3.2 Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung

Die Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen mit dem Schwerpunkt auf der Körper- und Herzentwicklung sollten entwicklungsmorphologische Schäden der Ozonierung während der Bebrütung aufdecken.

1.Versuchsreihe: PS BT 3, PS BT 4 und PS BT 5 am ET 8

Eine rasterelektronenmikroskopische Auswertung erfolgte in dieser ersten Untersuchungsreihe nur an den bis zum BT 8 überlebenden Tieren.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Kopfes

Die Untersuchung der Kopfmorphologie der beiden am ET 8 lebenden Tiere des Versuchs PS BT 3, ergab für das eine Tier eine normale Entwicklung (Abb. 43) im Vergleich mit der Kontrolle (Abb. 42) und für das andere eine deutliche Hypoplasie der Schnabelanlage, welche auf ein retardiertes Wachstum des Embryos hinweist (Abb. 44). Sehr prominent erschien die Augenanlage, die zweidrittel der Schädelformation einnimmt. Deutlich sichtbar war auch die Linsenplakode. Sowohl bei der Kontrolle, als auch bei dem regelkonform entwickelten ozonierten Tier war die Anlage des Eizahns als kleine Erhebung auf der Mitte des Oberschnabels zu erkennen.

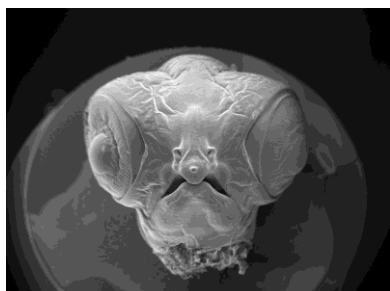


Abb. 42: Kontrolltier mit normaler Kopfmorphologie



Abb. 43: Ozoniertes Tier mit normaler Kopfmorphologie

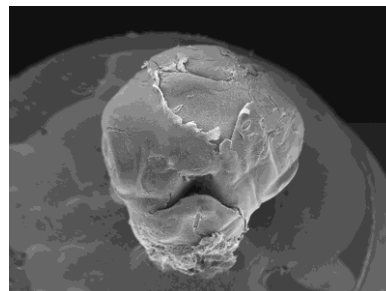


Abb. 44: Ozoniertes Tier mit deutlich retardiert erscheinender Kopfmorphologie

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Rumpfes

Die Untersuchungen der Kontrolltiere (Abb. 45) im Vergleich zu den beiden überlebenden Tieren (Abb. 46 und 47) des Versuchs PS BT 3 ET 8 nach dem Einwirken der hohen Ozonkonzentration über 1 h zeigten keine morphologischen Missbildungen des Körperstammes und der Gliedmaßen. Deutliche artifizelle Schädigungen sind während der Präparation entstanden. Die Untersuchungen am sich entwickelnden Herzen in beiden Gruppen lassen folgende Befund zu: Am Herz der Kontrolle war eine

Unterscheidung der beiden Herzkammern möglich, wobei die linke Kammer die Herzspitze formte (Abb. 48). Das ozonierte Tier dagegen zeigte am BT 8 eine deutlich stumpfkegelige Form des Herzens, die rechte und die linke Herzkammer waren voneinander zu unterscheiden. Auf der Grenze zwischen den beiden Ventrikeln zeigte sich eine deutliche Erhebung (Abb. 49). Dies war bei dem zweiten ozonierten Tier, welches bis zum BT 8 überlebte hatte, nicht der Fall. Das Herz erschien weniger differenziert, als bei den vorher gezeigten Tieren, eine Unterscheidung der beiden Herzkammern war adspektorisch nicht möglich (Abb. 50).



Abb. 45: Der Rumpf eines normal bis zum BT 8 entwickelten Kontrolltiers.

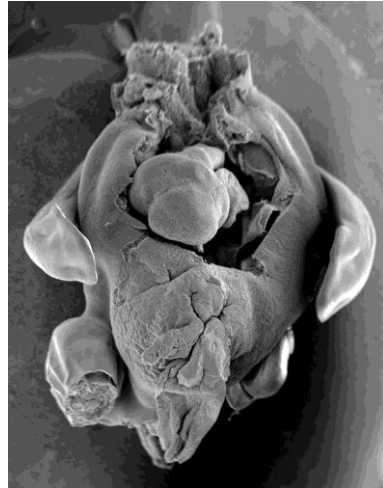


Abb. 46: Der Rumpf eines bis zum BT 8 überlebenden Tieres, das am BT 3 mit 5%/1h begast wurde. Es waren keine morphologischen Abweichungen feststellbar. Die Hintergliedmaßen wurden bei der Präparation abgelöst.



Abb. 47: Der Rumpf des zweiten überlebenden Tieres des Versuchs PS BT 3 ET 8 erscheint in seiner Entwicklung retardiert, ohne jedoch Missbildungen aufzuweisen.

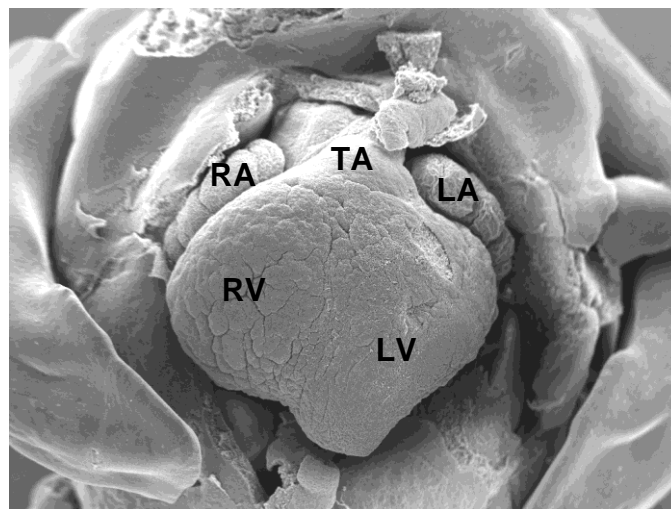


Abb. 48: Die normale Herzsilhouette am BT 8 bei einem Kontrolltier. Die Herzkammern sind voneinander abgrenzbar (RV, LV), die linke Kammer bildet die Spitze. Die Vorkammern (LA, RA) sind deutlich sichtbar beidseits des Truncus arteriosus (TA).

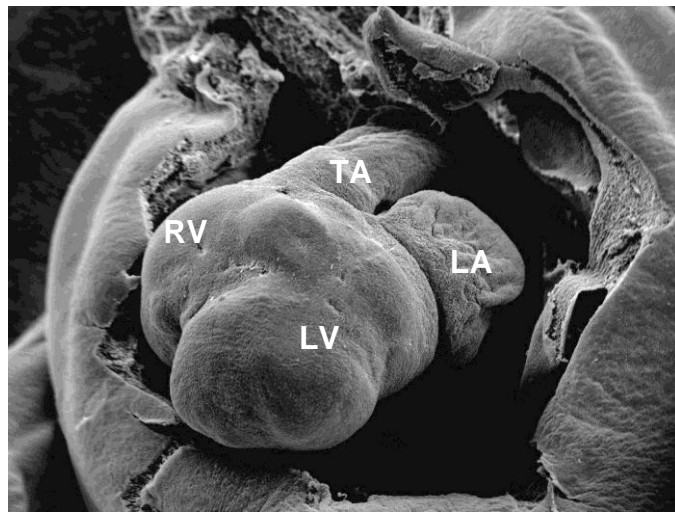


Abb. 49: Stumpf kegelig erscheinende Herzsilhouette eines ozonierten, bis zum ET Brutttag 8 überlebenden Tieres. Rechte und linke Herzkammer bzw. Ventrikel (RV, LV) sind voneinander abgrenzbar. Das rechte Atrium (RA) und das linke Atrium (LA) sowie der Truncus arteriosus (TA) sind zu erkennen. Deutlich war eine Erhebung zwischen den beiden Ventrikeln zu erkennen.

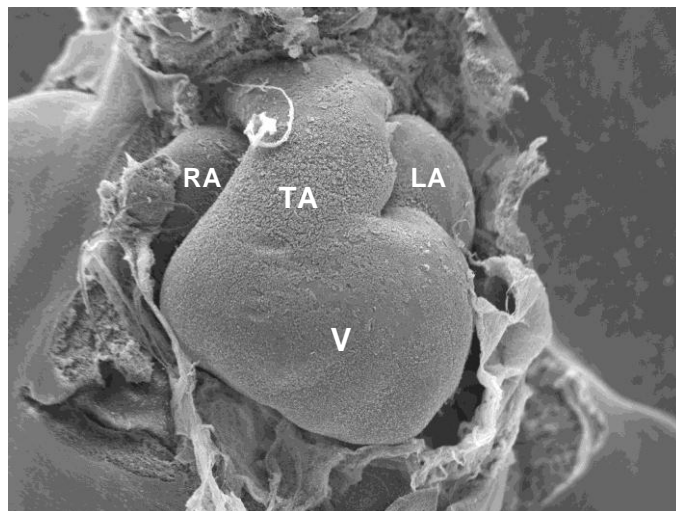


Abb. 50: Das Herz des am ET Brutttag 8 lebend entnommenen Tieres nach der Begasung am BT 3 erscheint wenig differenziert und eine Unterscheidung von rechter und linker Herzkammer ist äußerlich nicht möglich. Der Truncus arteriosus (TA) sowie das linke und rechte Atrium (LA, RA) sind erkennbar.

2. Versuchsreihe: PS BT 3, PS BT 4 und PS BT 5 am ET 6

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Kontrolltiere

Der Kopf und der Körper der vitalen Kontrolltiere am BT 6 zeigten einen altersgemäßen Entwicklungsstand (Abb. 51 und 52). Die Herzsilhouette an diesem BT zeigte eine spitz zulaufende Form (Abb. 53) oder eine stumpfere Form (Abb. 54). Die äußere Demarkation der beiden Herzkammern fiel noch schwer, während die Vorkammerformation deutlich sichtbar war.



Abb. 51: Die normale Kopfmorphologie am BT 6 eines Kontrolltieres zeigt die prominente Augenanlage und eine deutliche Ober- und Unterschnabelbildung.



Abb. 52: Die normale Körpermorphologie eines Tieres am BT 6.

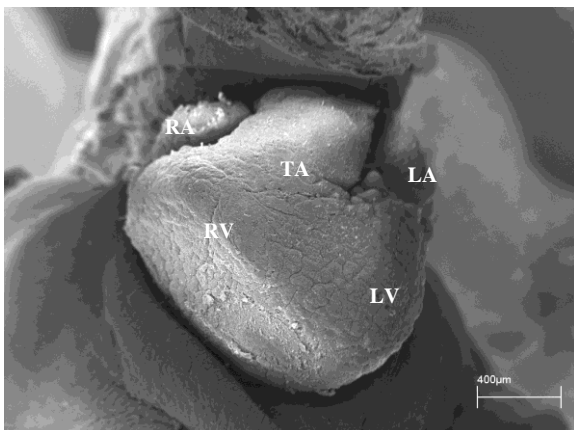


Abb. 53: Darstellung der Herzsilhouette am BT 6 bei einem Kontrolltier. Dabei wies das Herz eine spitz-kegelige Form auf. Die äußere Demarkation eines rechten und eines linken Ventrikels (RV und LV) ist noch nicht möglich, ihre Grenze war durch die Formation des Truncus arteriosus (TA) bestimmt. Die Anlage des rechten sowie linken Atriums (RA und LA) war bereits sichtbar.

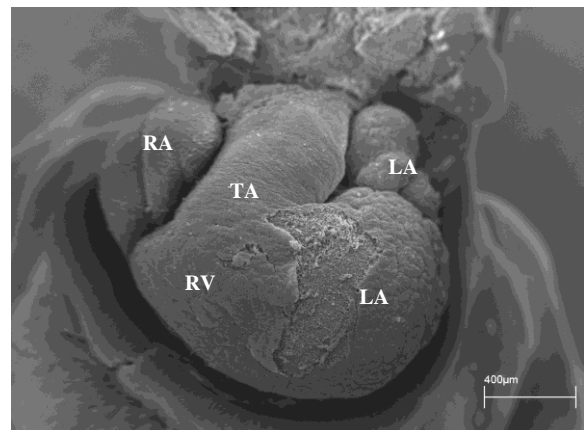


Abb. 54: Darstellung der Herzsilhouette am BT 6 bei einem Kontrolltier. Dabei wies das Herz eher eine stumpf-kegelige Form auf und die Unterscheidung der beiden Ventrikel (RV und LV) ist äußerlich nicht möglich sondern ließ sich nur auf Grund des Verlaufs des Truncus arteriosus (TA) vermuten. Deutlich war die Formation des linken und rechten Atriums zu erkennen (LA und RA).

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen PS BT 3 ET 6

Von den 15 Eiern, die nach der Begasung am BT 3 am ET 6 zur rasterelektronenmikroskopischen Auswertung kamen, wiesen vier keine Entwicklung auf und zehn hatten zwar den Entwicklungsstand des BT 3 erreicht, sind aber vor der Entnahme am BT 6 verstorben. Die Entwicklung dieser zehn Tiere verlief morphologisch normal und endete bei neun der zehn Tiere am BT 3 (HH 20) bzw. am BT 4, also kurz nach der Applikation des Ozons (Abb. 55). Die Entwicklung eines der zehn Tiere endete erst am BT 5 (HH 25-26) und ist ebenfalls ohne Abweichung von der Norm (Abb. 56). Das einzige am ET 6 mit einem Herzschlag vitale Tier, zeigte eine normale morphologische Entwicklung. Es erscheint kleiner und kann somit in das Stadium HH 27-28 eingestuft werden (Abb. 57).

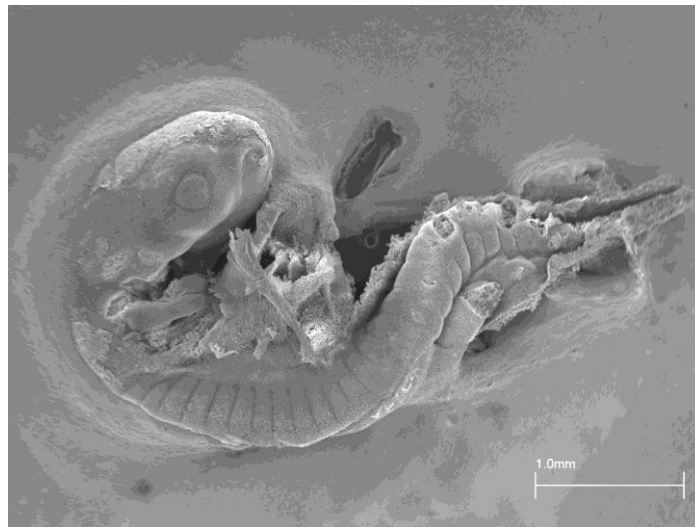


Abb. 55: Darstellung eines Embryonen, dessen Entwicklung kurz nach der Begasung ca. im Stadium HH 20 endete.

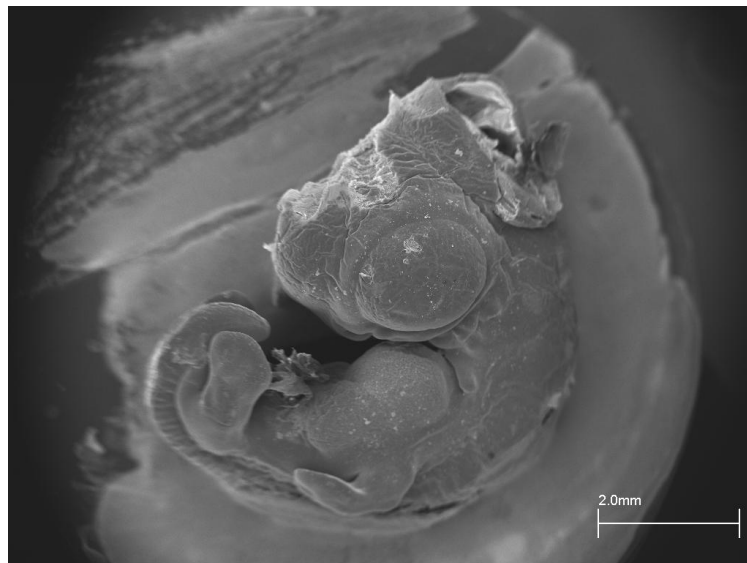


Abb. 56: Überlebender Embryo nach der Begasung am BT 3. Er erscheint etwas retardiert im Vergleich zu den Kontrolltieren und würde in das Stadium HH 27-28 eingestuft werden.

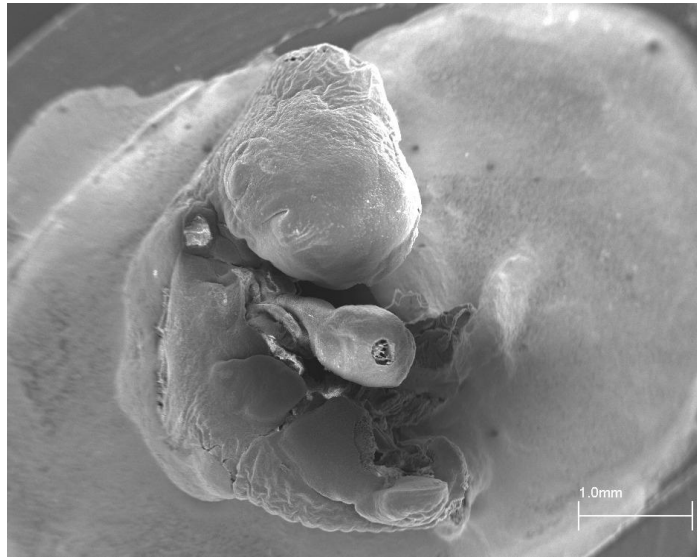


Abb. 57: Die Entwicklung des Embryos, der am BT 3 ozoniert wurde, endete etwa im Entwicklungsstadium HH 25-26 (ca. BT 4,5 bis 5). Seine morphologische Entwicklung ist normal.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen PS BT 4 ET 6

In dieser Untersuchungsgruppe wurden zwei der 15 Tiere bei der Entnahme am BT 6 als bereits vor der Begasung am BT 4 verstorben eingestuft, zwei weitere Eier zeigten keine Entwicklung und bei 11 Tieren kam es zeitnah nach der Begasung am BT 4 etwa im Stadium HH 23 zum Absterben (Abb. 58). Die Tiere wiesen keine morphologischen Veränderungen auf.



Abb. 58: Der am BT 4 ozonierte Embryo erreichte in seiner Entwicklung etwa das Stadium 23 nach HH, starb somit kurz nach der Begasung ab

Rasterelektronenmikroskopische Betrachtungen von am BT 5 ozonierten Tieren

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen PS BT 5 ET 6

Die 15 Tiere, die am BT 5 ozoniert wurden, starben unmittelbar nach dieser Behandlung ab. Abweichungen von der normalen morphologischen Entwicklung konnten nicht festgestellt werden. Darüber hinaus wurde die Herzformation beurteilt, wobei, soweit dies auf Grund der kraniokaudalen Krümmung möglich war, keine Abweichung von der Norm festgestellt werden konnte (Abb. 59-61).

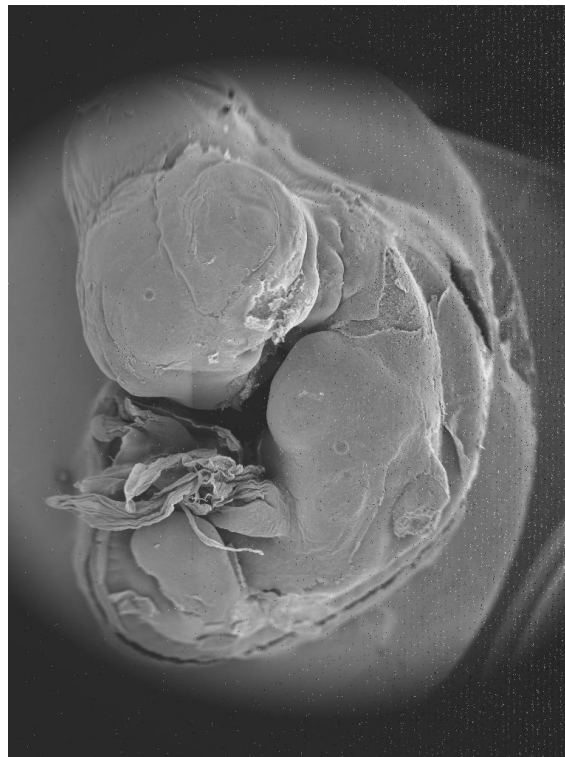


Abb. 59: Darstellung eines Embryo am BT 5 mit geschlossener Körperhöhle

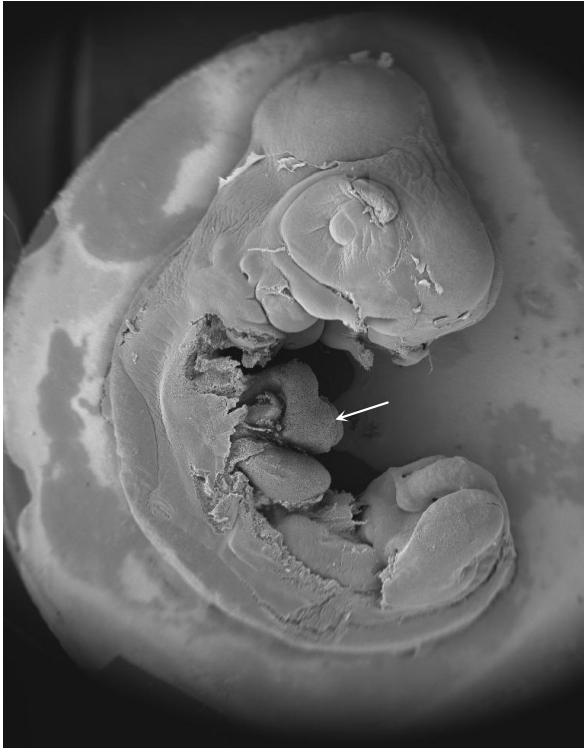


Abb. 60 und Abb. 61: Am BT 5 ozonierte und unmittelbar danach abgestorbene Embryonen mit Einsicht in die Körperhöhle von rechts (Abb. 60) und links (Abb. 61). Die Herzanlage ist deutlich zu erkennen (weiße Pfeile).

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin festzustellen, ob eine Begasung mit Ozon zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten des Hühnchens ein embryotoxisches Potenzial besitzt. Dies sollte im Rahmen des Projektes eine Aussage über die alternative Nutzung des Ozons zur Bruteidesinfektion ermöglichen. Gegenwärtig wird die Formalinbegasung angewendet, die auf Grund ihrer Kanzerogenität auf dem Prüfstand steht. Zunächst wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Applikation des Ozons vor dem Einsatz in den Brüter erfolgte. Die applizierte Konzentration und die EWZ wurden variiert, um die Wechselwirkung beider Parameter zu untersuchen. Da die Untersuchungen im Rahmen eines Projektes zur Ermittlung der nötigen Ozonkonzentration und Einwirkzeit zur Abtötung von *S. Enteritidis* auf der Eioberfläche stattfanden, erfolgte die Wahl der Parameter und auch deren Kombination in Abhängigkeit von den dort gewonnenen Reduktionsergebnissen.

Um eine zusätzliche Aussage über die Phasenspezifität von Ozon treffen zu können, also welche Auswirkung Ozon auf sich differenzierende Zellstrukturen hat, wurden in weiterführenden Untersuchungen eine hohe Ozonkonzentration und eine einstündige EWZ kombiniert und an drei unterschiedlichen Tagen während der Bebrütung appliziert. Die gewählten BT 3, 4 und 5 stellen kritische Zeitfenster innerhalb der Embryonalentwicklung des Hühnchens dar.

Die Auswirkungen von Ozon auf die Morphologie des Hühnerembryos bei der Begasung am BT 0

Zu den vereinzelt in der Literatur gemachten Angaben zur Schlupfrate nach der Ozonbegasung von Bruteiern (WHISTLER und SHELDON 1989), fehlen bisher fundierte Aussagen zur morphologischen Entwicklung der Embryonen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen jedoch die Schlussfolgerung zu, dass die angewendete Ozonkonzentration und die EWZ bei der Begasung am BT 0 bzw. vor der Bebrütung einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen nehmen.

Die verwendeten Bruteier der Rasse Lohmann-Weiss haben eine durchschnittliche Schlupfrate von 80-83%. Zur Einbringung in die Ozonkammer wurden die Eier auf eine Horde gegeben, so dass eine Umflutung mit dem Ozongas gewährleistet war. Die Bebrütung fand in einem Automaten bei 37°C und 75% Luftfeuchte statt. Dieser stets gleiche Ablauf erfüllt damit die Forderung nach Standardisierung des Versuchsablaufes und optimalen Bebrütungsbedingungen, um den Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf die Überlebens- und Spontanmissbildungsrate zu minimieren (LÜPKE 1982).

Der Einfluss verschiedener Ozonkonzentrationen auf die Überlebensrate, das Größen- und das Längenwachstum

Es konnte gezeigt werden, dass Ozon bei der Begasung mit **hohen Konzentrationen** von 5,22% und 5% kombiniert mit einer **langen Einwirkzeit** eine hochgradig embryotoxische Wirkung besitzt. Nur wenige Tiere überlebten (ÜLR 3,3% bis 10%), während die ÜLR der Kontrolltiere dieser Versuche zwischen 80 und 100% lagen. Schon bei der Kombination von 20 min EWZ und 3,0% Ozonkonzentration stieg die ÜLR auf 71,4% an, die der Kontrollen lag bei 100%. Die Begasung mit 2,8%, der niedrigsten Dosis der Hochdosisgruppe, erbrachte eine ÜLR von 90% (ÜLR der Kontrollen 100%). Somit konnte deutlich ein dosisabhängiger Effekt für Ozon bereits innerhalb der Versuchsgruppe mit hohen Ozonkonzentrationen zwischen 2,51% - 5,22% nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Versuche mit **mittleren** (1,1% - 2,5%) und **niedrigen Ozonkonzentrationen** (0,5% - 1,0%) stützen die Aussage des dosisabhängigen Effekts von Ozon. Die ÜLR der Versuchsgruppen mit mittleren Ozonkonzentrationen und niedrigen Ozonkonzentrationen lagen, mit einer Ausnahme (1,8%/17h), stets zwischen 90% und 100%. Nur WHISTLER und SHELDON (1989c) haben bisher für eine Studie mit vergleichbar hoher Ozonkonzentration auch das Schlupfergebnis angegeben. Ihre Untersuchungen zeigten eine Schlupfrate von 50% nach der zweistündigen Begasung von Bruteiern mit 3,03% Ozonkonzentration und liegen damit noch unter dem von uns ermittelten Ergebnis nach der Ozonierung mit 3%/20min von 71,4% ÜLR am BT 18. Eine mögliche Erklärung für das bessere Ergebnis kann der unterschiedliche Untersuchungszeitpunkt sein. So konzentriert sich die Mortalität der Embryonen während der Bebrütung auf drei kritische Perioden (ROMANOFF und ROMANOFF 1972). Diese Perioden erhöhter Empfindlichkeit beim Hühnerembryo liegen im Zeitraum des BT 4, des BT 11 und noch einmal des BT 19. Der von uns gewählte Untersuchungszeitpunkt am BT 18, also vor der dritten kritischen Periode, kann eine möglich Erklärung für die von uns ermittelte bessere ÜLR sein. Wichtiger erscheint hier aber der Faktor der EWZ. Diese war mit 2 h bei der Untersuchung von WHISTLER und SHELDON (1989c) deutlich länger als bei unserem Versuch mit einer EWZ von 20 min. Da unsere Ergebnisse bereits gezeigt haben, dass auch die EWZ einen wichtigen Einflussfaktor auf das Überleben darstellt (siehe unten), ist die von uns ermittelte bessere ÜLR bei annähernd gleicher Ozondosis im Zusammenhang mit der geringeren EWZ zu sehen. In weiteren Untersuchungen wurde erwiesen, dass eine sehr geringe Ozondosis von 2 ppm, das entspricht 0,002%, keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Embryonen und die Schlupfrate hat (QUILIGAN et al. 1958). Diese Aussage konnte durch die von uns ermittelten sehr guten ÜLR zwischen 90 und 100% in der Gruppe der niedrigen Konzentrationen (0,5% - 1,0%) bestätigt werden.

Das Eindringen von Ozon in das Eiinnere wird durch die Permeabilität der Eischale und das sehr ähnliche Molekulargewicht von Ozon im Vergleich zu Sauerstoff und Kohlendioxid ermöglicht (ROMIJN 1950; KUTCHAI und STEEN 1971). Deren Austausch findet über die Eischale statt, so

dass dies auch der Weg des Übertritts von Ozon in das Eiinnere ist (WHISTLER und SHELDON 1989c). Neben dieser Aufgabe als Grenz- und Kommunikationsort mit der Umwelt stellt die Eischale auch als mechanische Barriere einen wichtigen Einflussfaktor dar. Dies konnte durch vergleichende Studien von *in ovo*- und *in vitro*-Begasung anhand der Veränderungen der Eiinhaltsstoffe gezeigt werden (RUPP 2007). Während sich bei den *in ovo*-Versuchen keine signifikante Veränderung des Vitamin A-Gehaltes bei Applikation verschiedener Ozonkonzentrationen zeigte, kam es bei den *in vitro* Versuchen zur dosisabhängigen Reduktion des Vitamin A-Gehaltes. Da es in der Fragestellung des Projektes um Bruteibegasung und deren Auswirkung auf die ÜLR und die Morphologie der Embryonen ging, wurden in den von uns durchgeführten Untersuchungen nur Eier mit intakter Schale verwendet. Es ist davon auszugehen, dass die Auswirkung die Ozon auf die ÜLR der Embryonen hat, eine Summation aus den Faktoren Dosis, EWZ, Zeitpunkt des Einwirkens, Permeabilität und mechanischer Barriere darstellt.

Unsere Untersuchungen konnten auch den Beweis erbringen, dass auch die **Einwirkzeit** einen wichtigen Parameter darstellt. Dies konnte schon bei den Versuchen gezeigt werden, bei denen eine hohe Ozonkonzentrationen mit variablen EWZ eingesetzt wurden. Die ÜLR der Versuche mit hoher Ozonkonzentrationen in Kombination mit einer EWZ von 1 h lagen nur zwischen 3,3% (>5%/1h) und 10% (5,22%/1h), bei der Applikation von 5%/1h hat kein Tier überlebt. Verzichtete man auf eine EWZ, stieg die ÜLR auf 60% (5%/0min) an. Auch die von WHISTLER und SHELDON (1989c) bei der Applikation 3,03% Ozonkonzentration über 2 h ermittelte Schlupfrate von 50%, im Vergleich zu der ÜLR unserer Untersuchung von 71,4% bei einer annähernd äquivalenten Dosis von 3,0%, aber einer geringeren EWZ von nur 20 min zeigt den Einfluss des Parameters EWZ. Dieser aus unseren Analysen ermittelte Befund wird gestützt durch das Studiendesign von 1,8% und 17 h EWZ. In diesem Versuch betrug die ÜLR nur 10 % und war damit signifikant geringer als die der Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu überlebten alle Versuchstiere bei der Applikation einer ähnlichen Dosis von 1,9% und einer EWZ von 30 min. Zu vermuten ist, dass es bei dieser langen Einwirkzeit zu einer toxischen Kumulation gekommen ist, da durch das verlängerte Ausbleiben der Sauerstoffzufuhr und des Kohlendioxidabtransportes eine irreversible Schädigung der Blastomeren erfolgt. Dennoch ist anzunehmen, dass die Überlebensfähigkeit bei den niedrigen und praxisrelevanten Dosierungen (0,5% - 1%) stärker von der angewandten Ozonkonzentration abhängt als von der Einwirkzeit. Dieser Befund wird am Deutlichsten bei der Anwendung der Ozonkonzentration von 0,5% mit 24 h EWZ. Hier konnte eine ÜLR von 90% verzeichnet werden. Auch die Versuche mit Ozonkonzentration von 1,0% im Labormaßstab und 0,7% im Prototyp stützen diese Aussage. Es war kein Unterschied der ÜLR feststellbar, unabhängig davon, ob diese sehr niedrigen Konzentrationen mit 20 min (1%/20min) EWZ oder 2 h EWZ (0,7%/2h) kombiniert wurden. Es überlebten stets 90-100% der ozonierten Tiere.

Die Aktivität, die Ozon entwickelt, ist direkt durch seine molekulare Struktur begründet (HUNT und MARINAS 1999) oder wird durch die entstehenden Zerfallsprodukte erzeugt (KANOFISKY und SIMA 1991). Dennoch gibt es keinen Konsens darüber, wie Ozon seine toxische Wirkung an der Zellmembran entfaltet. Die Frage, ob die Schädigung durch die Oxidation der Lipide oder der Proteine in der Biomembran erfolgt, wird dabei am kontroversesten diskutiert (GOLDSTEIN und McDONAGH 1975, OHLROGGE und KERNAN 1983, PRYOR und CHURCH 1991). Sehr ausführlich wurde die Wirkung von Ozon an Zellen von Bakterien untersucht (GIESE und CHRISTENSER 1954, KIM 1998, KHADRE und YOUSEF 2001, KIM, YOUSEF und KHADRE 2003). Dabei konnten vier Angriffspunkte detektiert werden: 1. die ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran, 2. die LPS der gram-negativen Bakterien, 3. die intrazellulären Enzymsysteme und 4. das genetische Material.

Viele Autoren wiesen nach, dass v. a. die Lipidperoxidation der Zellmembran durch Ozon schädigend wirkt und auch die dabei entstehenden Aldehyde, Peroxide und freie Radikale zytotoxisch sind (PRYOR und CHURCH 1991). Die Wirkung dieser Stoffwechselprodukte darf nicht außer Acht gelassen werden, da Ozon auf Grund seiner hohen Reaktivität nicht fähig ist tief in das Gewebe einzudringen, so dass es für die nachweislich entstandenen Schäden nicht ausschließlich selbst der Grund sein kann (PRYOR et al. 1996). Vielmehr ist anzunehmen, dass die entstandenen Reaktionsprodukte, beispielsweise in Form der Radikale, zu den destruktiven Veränderungen geführt haben (RUPP 2006). Untersuchungen von RUPP 2006 ergaben einen signifikanten Anstieg von Cholesterinoxidationsprodukten (COP), die sowohl mutagen als auch zytotoxisch wirken (RUPP 2006) und die Zelle einem oxidativen Stress aussetzt. Es ist zu vermuten, dass Ozon an der Lipiddoppelschicht der Blastomeren ähnliche Wirkmechanismen entfaltet, indem es mit dem ungesättigten Lipid Cholesterin reagiert. Cholesterin, das mit seiner Doppelbindung sehr angreifbar für Ozon ist (BAILEY 1957), stellt ein funktionell bedeutsames Lipid der Zellmembran dar. Es reguliert temperaturabhängig die Membranfluidität, erhöht die Membranstabilität und beteiligt sich mit den Proteinen an der Ein- und Ausschleusung von Signalstoffen. Die sich durch die Peroxidation ändernde Membranpermeabilität und –fluidität führt in der Folge zum Austritt intrazellulärer Bestandteile, zur Schädigung des genetischen Materials und somit zum Tod der Zelle (PRAT et al. 1965, SHECHTER 1973). Der auf die Zellmembran wirkende oxidative Stress führt somit zu einer Störung der Balance zwischen den Oxidations- und Antioxidationsmechanismen und kann zum Zelltod führen (SIES 1985). Der Zelltod kann dabei auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen – der Apoptose oder der Nekrose. Die Apoptose ist ein komplexer Prozess, der von Zellschrumpfung, Chromatinverdichtung und der Fragmentierung der Kern-DNA gekennzeichnet ist. (KERR et al. 1972, WYLLIE et al. 1980, McCONKEY et al. 1988). Sie stellt einen streng geregelten Zellab- und Zellumbauprozess dar und dient der Beseitigung von geschädigten Zellen durch die Aktivierung von Caspasen (DeLONG 1998). Studien konnten zeigen, dass oxidativer Stress ein auslösender Faktor für

die Apoptose ist (CHANDRA et al. 2000). Darüber hinaus ist zusätzlich in Abhängigkeit von der wirkenden Dosis das Umschalten von der Apoptose auf Nekrose möglich (MELINO et al. 1997). Die genaue Fähigkeit der Blastomere des Vogels zur spontanen oder stressinduzierten Apoptose ist noch nicht abschließend untersucht (BLOOM 1998). Dennoch konnte gezeigt werden, dass unbebrütete Blastomeren selbst bereits zur Apoptose fähig sind (EYAL-GILADI und KONCHAV 1976, BLOOM 1998). Dies scheint notwendig, um fehlerhafte Zellen zu eliminieren und die Zellanzahl zu regulieren (BLOOM 1998). So kann vermutet werden, dass es vor allem bei den Versuchen mit den hohen Ozonkonzentrationen und hohen Mortalitätsraten zu apoptotischen und nekrotischen Zellverlusten gekommen ist. Die Nekrose ist die Folge einer akuten zellulären Dysfunktion als Antwort auf einen Stressor oder Kontakt mit einem toxischen Agens. Sie ist ein relativ passiver Prozess, der morphologisch durch eine massive Volumenzunahme der Zelle und der Ruptur der Membran mit Ausschüttung des Zellinhaltes in das umgebende Gewebe gekennzeichnet ist (GORES et al. 1990). Dies wiederum kann zu weiteren Zellschädigungen bzw. zum Anlocken von proinflammatorischen Zellen führen (HASLETT 1992).

Der Einfluss von Ozon auf das genetische Material wurde im Rahmen des Projektes ebenfalls untersucht. Hier konnte mittels Comet-Assays eine signifikant erhöhte Anzahl von stark geschädigten Zellen (Klasse 3) nach der Behandlung mit einer hohen Ozonkonzentration festgestellt werden. Der Comet- Assay beruht auf dem Prinzip, dass geschädigte bzw. fragmentierte DNA einer Zelle aus dem Kernverband auswandern kann. Diese Fragmente erscheinen wie ein Komet. Je stärker die Fragmentierung der DNA, desto größer der Komet. Daraus ergibt sich dann eine Klasseneinteilung von „Klasse 1“ – unbeschädigte Zellen ohne Kometenschweif über, „Klasse 2“ - leicht geschädigte Zellen mit kleinem Schweif und „Klasse 3“ - stark geschädigte Zellen mit ausgeprägten Kometen, bis „Klasse 4“ - am stärksten geschädigte Zellen mit einem vollständig vom Zellkern getrennten Kometenschweif. Diese ozonabhängigen Wirkungen an der embryonalen DNA nach der Begasung mit hoher Ozonkonzentration lassen vermutlich keine normale Entwicklung des Embryos mehr zu (RUPP 2006) und sind Ursache der hohen Mortalitätsrate innerhalb der ozonierten Versuchsgruppen unserer Untersuchungen. Auch die mittlere Ozonkonzentration führte zu signifikanten Unterschieden der Anzahl der geschädigten Zellen zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe. Der Grad der Schädigung war hier allerdings geringer. Dies zeigte sich deutlich durch das Auftreten von nur kleinen Kometen, so dass nur eine Einstufung in die Klasse 2 erfolgte. Die von uns erhobenen besseren Überlebensraten dieser Versuchsgruppe korrespondieren mit diesen biochemisch gewonnenen Ergebnissen und können wahrscheinlich mit den in den Zellen vorhandenen DNA-Reparaturmechanismen erklärt werden, die diese kleineren Schäden noch beheben können. Eine Aussage über den Grad der Schädigung, die keine Entwicklung der Embryonen mehr zulässt, kann mit dieser Untersuchung aber nicht getroffen werden (RUPP 2006).

Neben den angesprochenen Reparaturmechanismen der DNA gibt es Beweise für eine Resistenz der Blastomeren gegen umweltbedingte Stressoren, die unweigerlich zum Zelltod führen können (ARORA und KOSIN 1968). Dies ist biologisch sinnvoll, da die entwickelnden Eier in der freien Natur einer Vielzahl suboptimaler Faktoren wie physischer Traumata, Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsschwankungen ausgesetzt sind und trotzdem ein erfolgreiches Entwicklungspotenzial aufrecht erhalten können (MARZULLO 1970, PETTITE et al. 1990, ETCHES et al. 1997). Die Mechanismen dieser Resistenz beim Hühnerembryo sind bisher nur wenig erforscht. Es wird vermutet, dass ein Baustein die erhöhte Expression von anti-apoptotischen Regulatorgenen ist, die den programmierten Zelltod verhindert. Dieser Prozess der Apoptosereduktion könnte parallel durch eine Expressionsverringerung pro-apoptotischer Gene (Caspasen oder Onkogene) unterstützt werden. Das Vorliegen beider Mechanismen in einer Zelle ist möglich. Die Fähigkeit zur Expression von drei anti-apoptotischen Regulatorgenen besitzen die Blastomeren des Vogels bereits ab Stadium 1 nach HH (BT 1) (BLOOM 1998). Es handelt sich dabei um die Regulatorgene *bcl-2*, *bcl-x_L* und *hsp70*. Auch wenn eine vollständige Klärung der anti-apoptotischen Effekte von *bcl-2* und *bcl-x_L* noch nicht gelungen ist, sind die Aufgaben von *bcl-2* unter anderem die der Regulation der Porenöffnung der Mitochondrien (ZAMZAMI et al 1996) und der Blockade der Caspaseaktivität. Dies verhindert die Freisetzung von Cytochrom c und die Initiierung der Apoptose. Darüber hinaus ist *bcl-2*, durch seine Fähigkeit als Radikalfänger zu fungieren, am Schutz vor oxidativen Stress beteiligt (HOCKENBERRY et al 1993). *Hsp70* (Hitzeschockprotein) wird auch ohne Einwirken von Stressoren in der frühen Phase der Entwicklung exprimiert, so dass man annimmt, dass dies zur relativen Resistenz der Zellen gegenüber stressinduzierter Apoptose ebenfalls beiträgt. Inwieweit dies auch für die Einwirkung von chemischen Substanzen gilt, ist noch nicht bekannt (BLOOM 1998).

Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse, so kann die Aussage von JELINEK (1982), dass die Entstehung eines embryotoxischen Potentials immer u. a. von der Dosis, dem Applikationszeitpunkt und der Sensitivität des sich entwickelnden Systems abhängt, bestätigt werden. Dass es über die beschriebene Wirkung hinaus zu einer Umwandlung von Ozon in aktive oder inaktive Ab- bzw. Umbauprodukte im Rahmen eines eigenen metabolischen Systems des embryonierten Eies kommt, kann ausgeschlossen werden, da laut JELINEK (1982) ein solches System erst ab dem zweiten Bebrütungstag beim Hühnerembryo vorhanden ist.

Eine Betrachtung der morphologischen Entwicklung und der inneren Organe fand bei dem bereits erwähnten Schlupfversuch von WHISTLER und SHELDON (1989c) nicht statt, so dass ein direkter Vergleich mit den von uns gewonnenen Ergebnissen nicht möglich ist. Die teilweise signifikante bzw. deutlich feststellbare Reduktion des Längenwachstums und des Gewichtes der ozonierten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ist als Folge der *in ovo*-Begasung zu sehen. Beim Einleiten des Ozons kommt es zusätzlich aber auch zur Verringerung des Sauerstoffgehaltes in der Begasungskammer. Die Sauerstoffversorgung ist ein essentieller Faktor für die Entwicklung des Hühnerembryos und die

Wirkungen eines Abfalls muss ebenfalls in Betracht gezogen werden. Der Grund für den starken Einfluss einer Hypoxie liegt in der sehr geringen Leitfähigkeit der Eischale und der Schalenhäute für Sauerstoff im Verhältnis zum Bedarf des sich entwickelnden Embryos in der ersten Woche der Bebrütung (KAYAR et al 1981). Unter normoxischen Bedingungen arbeitet dieses System zu diesem Zeitpunkt bereits am Limit und wird mit Einsetzen einer Hypoxie insuffizient (MEUER und BAUMANN 1988). Es ist allgemein anerkannt, dass eine Sauerstoffmangelsituation während des embryonalen Wachstums Einfluss auf die körperliche Entwicklung hat (GIUSSANI et al 2007). CHAN und BURGGREN (2005) haben in ihren Untersuchungen an Hühnerembryonen mit 15% O₂ in der Bebrütungsluft eine Auswirkung auf die Schnabellänge festgestellt, wenn der Sauerstoff innerhalb der ersten 6 BT *während* der Bebrütung reduziert wird. Dieses verminderte Wachstum war bei den Untersuchungen am BT 12 nachweisbar. Fand nach dem BT 6 die weitere Bebrütung unter normoxischen Zuständen mit einem O₂-Gehalt von 21% in der Bebrütungsluft statt, war eine signifikante Reduktion des Schnabelwachstums am BT 18 nicht mehr zu detektieren. Zu vergleichbaren Ergebnissen führten Untersuchungen zur Gewichtsentwicklung nach dem Einwirken einer Hypoxie in den ersten 6 bzw. 10 BT (DZIALOWSKI et al. 2002, MILLER et al. 2002). So stellten DZIALOWSKI et al. (2002) eine signifikant geringere Gewichtsentwicklung der Embryonen am BT 12 fest, nach der Applikation von 15% O₂ in den ersten 6 BT, während MILLER et al. (2002) dies am BT 15 nach hypoxischer Episode (14% O₂) von BT 0 - BT 10 nachwies. Beide Studien zeigten, dass diese sich aber bis zum BT 18 bzw. bis zum Schlupf normalisierte und sich die Feten altersgerecht entwickelten. Ein Unterschied dieser Arbeiten zu den von uns durchgeführten Untersuchungen, mit EWZ zwischen 20 min und 24 h, ist die lange hypoxische Episode über sechs bzw. zehn Tage. Aber auch eine Studie zur Wirkungen eines erniedrigten Sauerstoffpartialdruckes von 10% über kurze Zeiträume von 2, 4 und 6 Stunden während der frühen Embryonalentwicklung am BT 2 und 3 und 4 zeigten keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der überlebenden Tiere am BT 9 (ALTIMIRAS und PHU 2000). Das Ausbleiben eines permanenten Effektes bei der Wirkung eines verringerten Sauerstoffpartialdruckes in der frühen Embryonalentwicklung auf die überlebenden Tiere erklären die Autoren damit, dass der Embryo einer einfachen Strategie, nämlich dem **Schwarz-Weiß-** bzw. dem **Alles-oder-Nichts-Prinzip** folgt. Entweder die Schädigung ist so stark, dass es zu keiner Entwicklung kommt oder aber die Entwicklung verläuft normal. Da bei den von uns durchgeführten Versuchen die Begasungen und damit der Abfall des Sauerstoffpartialdruckes vor der Bebrütung stattfanden, kann man davon ausgehen, dass die von uns festgestellte Reduktion des Wachstums und des Gewichtes möglicherweise eher auf das Einwirken des Ozons, als auf den parallel dazu vorhandenen Sauerstoffmangel, zurückführen ist. Das Prinzip der Wirkung, also Alles-oder-Nichts, kann für Ozon ebenso vermutet werden. Dies wird bei der Betrachtung der Gewichts- und Längenentwicklung für die Versuche deutlich, bei denen die Begasung mit hohen Ozonkonzentrationen und langen EWZ stattfanden. In beiden durchgeführten Versuchen (5,22/1h und

5%/1h) konnten für das jeweils einzig überlebende ozonierte Tier am BT 6 für die Längen- und für die Gewichtsentwicklung geringere Werte ermittelt werden. Untersuchungen am BT 12 zeigten für die Gewichtsentwicklung der überlebenden untersuchten Tiere des Versuches 5%/1h signifikant geringere Werte und das eine überlebende Tier des Versuches 5,22%/1h war ebenfalls leichter als die Kontrolltiere. Das einzige bis zum BT 18 überlebende Tier aus dem Versuch 5,22%/1h wies eine geringere Gewichtsentwicklung im Vergleich zu den unbegasteten Kontrolltieren auf. Ähnlich verhielt es sich mit der Längenentwicklung. Die Scheitel–Steiß-Länge des jeweils einzig überlebenden Tieres am BT 6 beider Versuche blieb deutlich unter dem Mittelwert der Kontrolltiere. Die Ergebnisse am BT 12 und BT 18 bestätigten die Befunde jedoch zeigte sich beim Versuch mit 5%/1h am BT 12 kein signifikanter Unterschied in der Längenentwicklung. Die bereits angesprochene Studie zur Wirkung einer Sauerstoffreduktion während der BT 1- BT 6 lassen BURGREN und CHAN (2005) die These vertreten, dass die Embryonen eine Art **Kompensationsvermögen** besitzen, das ihnen ermöglicht, das zwischenzeitlich retardierte Wachstum bis zur fast finalen Fetalentwicklung am BT 18 ausgleichen zu können. Dies ist möglich durch die Deckung des Sauerstoffbedarfes durch anaeroben Stoffwechsel. Diese Fähigkeit der Embryonen zur Kompensation ist vermutlich auch nach dem frühen Wirken von Ozon der Grund für die vergleichbare gute Entwicklung der überlebenden Tiere am BT 18, 19 oder 20 nach dem zwischenzeitlich retardierten Wachstum.

Ein Erklärungsmodell für das Überleben von Einzeltieren nach chemischer Extremsituation, wie im Falle unserer Ozonbegasung, können neben der erwähnten Stressresistenz auch ausgewählte Eiinhaltsstoffe, besonders Vitamin E und C, sein. Beide antioxidativ wirkenden Vitaminfraktionen bieten einen sicheren Schutz vor den schädigenden Effekten der COP. Laut GAAL et al. (1995) und SURAI et al. (1999) beeinflusst die Konzentration von Vitamin E und C im Eigelb die Funktionsfähigkeit des antioxidativen Stoffwechsels während der Embryonalentwicklung und im frühen postnatalen Stadium. Kommerziell gehaltene Hennen bekommen durch die Fütterung ein Überangebot an Vitamin E, so dass der Gehalt im Eidotter auf bis zu 120µg/ml ansteigt (PAL et. al 2002). Damit erhöht sich auch die Möglichkeit der Wechselwirkung von Ozon mit dem Vitamin-E-Molekül (Tocopherolmolekül), wobei durch die Oxidation ein Tocopherylradikal entsteht, das eine abgeschwächte peroxidative Wirkung aufweist (BURTON und INGOLD, 1986). Dieses kann durch Reduktion mit Hilfe von Vitamin C (Ascorbat) erneut in ein Tocopherolmolekül umgewandelt werden und wieder als Antioxidans wirksam sein. Das entstandene Ascorbatradikal verbindet sich mit einem weiteren zu Dihydroascorbat und Ascorbat. So entsteht ein Regenerationskreislauf für das Vitamin E, der eine wichtige Schutzfunktion vor Oxidationen darstellt (KAGAN et al. 1992). An Lungenflüssigkeit durchgeführte Untersuchungen untermauern diese Aussage (ROMIEU 1998). Es hat sich gezeigt, dass durch die Zugabe von Vitamin C und E Lungenfunktionsstörungen, die durch Ozon ausgelöst wurden, weitgehend verhindert werden konnten. Zwar sind diese Regenerationsmechanismen bisher nicht für das Ei nachgewiesen, doch lassen Studien über das

Regenerationsvermögen von Vitamin C in Lebensmitteln (HAMILTON et al. 1998) die Annahme zu, dass dies auch für das Ei möglich ist. Die Kombination dieser antioxidativen Schutzmechanismen mit den bereits angesprochen Reparaturmechanismen könnten für die annähernd normale Entwicklung der Embryonen verantwortlich sein.

Die innerhalb des Projektes gewonnenen Erkenntnisse zeigen einen dosisabhängigen Effekt von Ozon auf die Entwicklung von Hühnerembryonen. Aussagen über einen „Schwellenwert“ können mit diesen Untersuchungen nicht getroffen werden, da die Auswahl der Parameter von den gewonnenen mikrobiologischen Ergebnissen und den technischen Möglichkeiten abhängig war und somit starken Variationen unterworfen war. Weiterführende Untersuchungen mit definierten Schwellenstufen der Kombinationen zwischen Ozonkonzentration und EWZ könnten dieser Fragestellung bedeutend näher rücken.

Einfluss auf die morphologische Entwicklung von Herz, Leber, Milz und Niere

Die erhobenen Organbefunde an Herz, Leber, Milz und Niere lassen den Schluss zu, dass bei der Entwicklung von lebensfähigen Embryonen bzw. Feten nach der Begasung mit Ozon auch deren Organentwicklung normal verläuft. Die Literaturangaben zur embryonalen Entwicklung der Organe stimmen mit den von uns gewonnenen Ergebnissen der ozonierten Tiere überein. Das **Herz** zeigte am BT 12 eine spitz zulaufende Form (LANGE 2005). Die für das Alter typische Unterteilung in zwei Vorkammern und zwei Herzkammern war feststellbar. Die Trabekel waren, neben dem sich bereits kompaktierenden Myokard, zu sehen (ROMANOFF 1960, SEDMERA et al. 1997). Eine Querstreifung, ist erst nach endgültiger Ausrichtung der Myofibrillen in den reifen Kardiomyozyten sichtbar. Dies ist ab dem BT 15 der Fall (MANASEK 1970), so dass dies bei den am BT 12 untersuchten Herzen nicht zu detektieren war. Die mikroskopischen Befunde an Herzproben am BT 18, 19 oder 20 waren durch eine Querstreifung, das Auftreten von Glanzstreifen und eine Anordnung der Kardiomyozyten zu Faserbündeln charakterisiert (LANGE 2005). Der von der Norm abweichende Befund einer verstärkten Lymphozytenansammlung in der Herzkammer eines ozonierten Tieres ist sehr wahrscheinlich nicht mit der Ozonbegasung in Zusammenhang zu bringen, da er auch bei den Kontrolltieren sichtbar war.

Das makroskopische Erscheinungsbild der **Leber** als ein kompaktes Organ mit scharfen, glatten Rändern konnte bei der Entnahme am BT 12 und auch am BT 18, 19 oder 20 bei den begasten und unbegasten Versuchsgruppen festgestellt werden. Die beschriebenen Farbvariationen bezogen sich lediglich auf verschiedene Untersuchungszeitpunkte während der Bebrütung (BT 12 im Vergleich mit BT 18,19 oder 20), nicht auf Unterschiede zwischen den ozonierten und nicht ozonierten Tieren eines Versuchs. Aus diesem Grund sind diese im Rahmen der zunehmenden Funktion der Leber als Stoffwechselorgan zu erklären (ROMANOFF 1960). Die bis zum BT 7 vorherrschende rote bzw. rot-braune Farbe der Leber spiegelt dabei ihre Funktion als blutbildendes Organ, v. a. der Erythropoese

wider. Die Veränderung der Färbung zu gelblich bis hell orange-gelb bis zum Ende der Bebrütung ist Ausdruck der zunehmenden Cholesterolspeicherung in den Leberzellen und den zusammen mit dem Lipid transportierten gelben Pigmenten aus dem Dotter (KINGSBURY et al. 1956). Zusätzlich beginnt zwischen BT 6 und BT 7 die Gallenproduktion (SANDSTRÖM und WESTMAN 1971). Der einzelne auffallende Befund der Leber des ozonierten und einzig überlebenden Tieres des Versuchs 1,8%/17h, welche am BT 19 noch eine grüne Farbe aufwies, im Vergleich zu ocker-gelb bei den Kontrolltieren, bildet hier eine Ausnahme. Korrespondierend zu diesem makroskopischen Befund ergab die histopathologische Untersuchung eine Cholestase bei diesem Tier. Bei keinem weiteren Versuch dieser mittleren Konzentrationsgruppe und auch nach der Begasung mit hohen Konzentrationen und vergleichbar schlechten ÜLR, zeigte sich diese Abweichung. Aus diesem Grund ist es wohl als Zufallsbefund zu werten. Die histologische Untersuchung zeigte am BT 6 und BT 12 weitlumige Lebersinusoide und eine wenig kompakt erscheinende Organstruktur. Die ersten Hepatozyten am BT 12 zeigen einen unterschiedlichen Gehalt an Glycogen und Lipidtropfen (WONG und CAVEY 1992). Die Leberzellen sind in Strängen angeordnet. Elektronenmikroskopische Untersuchungen wiesen nach, dass diese Stränge einen zylindrischen Aufbau zeigen und die Hepatozyten eine pyramidale Form haben (WONG und CAVEY 1992). Die apikalen Zelloberflächen grenzen an ein Gallenkanälchen an, welches durch das Zentrum eines Stranges läuft. Der basale Zellanteil flankiert die Sinusauskleidung. Durch lichtmikroskopisch untersuchte Längsschnitten der Leber kam es auf Grund dieses Aufbaus in früheren Veröffentlichungen zu der Annahme verschiedener Autoren, dass die Leber des Huhns ein der Säugerleber vergleichbares histologisches Bild aufweist. Dabei wurden die angeschnittenen Leberzellstränge mit dem Gallenkanälchen als Leberzellplatten interpretiert (WONG und CAVEY 1992). Erst ROMANOFF (1960) stellte fest, dass im Vergleich zur Leber der Säuger, bei dem sich die Leberzellplatten radial um eine Zentralvene formieren, die Leberstruktur des Vogels durch Verzweigung von Zellsträngen geprägt wird, deren Lumina die Gallengänge darstellen.

Auch zu späteren Entnahmezeitpunkten lässt sich kein pathohistologischer Befund an der Leber feststellen. Die Lebersinusoide erscheinen weniger dilatiert als an den BT 6 und BT 12. Die kompakte Gewebestruktur der Leber erinnert an eine fast vollendete normale Fetalentwicklung (ROMANOFF 1960). Eine deutliche Lobulierung der Leber beim Vogel ist nicht zu erkennen (ROMANOFF 1960, HODGES 1972).

Die makroskopische Anatomie der **Milz** der Tiere beider Versuchsgruppen am BT 12 bzw. BT 18, 19 oder 20 mit einer braun-rötlichen Färbung, einer glatten glänzenden Oberfläche und der kugeligen Form entsprechen einer normalen Entwicklung beim Vogel. Die mikroskopische Auswertung am BT 12 unterblieb auf Grund der geringen Größe des Organs, die eine Aufbereitung mit den gegebenen technischen Voraussetzungen verhinderte. Die histologischen Untersuchungen am BT 18, 19 oder 20, die das Vorliegen einer Kapsel und die nicht sehr deutliche Unterscheidung von roter und weißer

Milzpulpa nachwiesen, lassen den Schluss zu, dass die Organentwicklung normal verläuft, wenn das Tier nach der Ozonierung überlebt. Als Zeichen für die Aktivität der Milz als Speicherorgan von Erythrozyten lassen sich deutlich kernhaltige Erythrozyten in der roten Milzpulpa erkennen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung, am BT 18, 19 und 20, sind sie bei einer normalen Entwicklung die einzigen Vertreter der erythroiden Zelllinie. Während am BT 12 noch die Proerythroblasten dieser Linie überwiegen, sind diese, als Ausdruck der in der Milz stattfindenden Erythropoese, ab dem BT 15 in verminderter Anzahl und ab dem BT 18 gar nicht mehr zu detektieren (YASSINE et al. 1989). Die mit Hilfe der Hämatoxilin-Eosin-Färbung beurteilten Erythrozyten unterstützen die Aussage, dass eine normale Organentwicklung stattgefunden hat. Eine genauere Beurteilung zusätzlich auch der granulozytären Zelllinie zur Untermauerung wäre nur mit spezielleren Färbetechniken möglich gewesen, was aus projekttechnischen Gründen unterblieb.

Die Untersuchungen der **Niere** ließen keinen Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den ozonierten Tieren erkennen. Die am BT 18, 19 oder 20 entnommene Nachniere als definitives Exkretionsorgan erscheint deutlicher dreigeteilt als die am BT 12. Dieser Unterschied ist Ausdruck der geringeren Reifung. Seine funktionelle Aufgabe übernimmt die Nachniere ab dem BT 12 (ROMANOFF 1960). Zu diesem Zeitpunkt ist der Großteil der Nephronen bereits vollständig ausdifferenziert und liegt dicht gepackt. Sie sind rund und die zentral liegende Zellmasse ist mit der Ausnahme des Kapillarpols vollständig umgeben vom sogenannten Harnspalt. Dieser entsteht zwischen den beiden Zelllagen der Bowmanschen Kapsel (NARBAITZ und KACEW 1978). Die vereinzelt sichtbaren Nierenkörperchen mit einem eher halbmondförmigen Harnspalt sind Ausdruck eines weniger reifen Stadiums. Ihr Auftreten in der Peripherie der Nierenläppchen am BT 12 ist laut NARBAITZ und KACEW (1978) normal. Eine deutliche Teilung in Mark und Rinde ist nicht zu erkennen, was eine typische Erscheinung der Vogelnieren darstellt (ROMANOFF 1960). Bereits an der Urniere der untersuchten Tier am BT 6 ließen sich die Strukturen Urnierenkörperchen, Urnierenkanälchen und ein Urnierengang unterscheiden. Dies ist Ausdruck ihrer embryonalen Funktionsfähigkeit. Die Ausdifferenzierung der Urniere ist bereits am BT 5 vollständig abgeschlossen. Die sich bereits parallel entwickelnde Nachniere besteht dagegen bis zum BT 7 lediglich aus undifferenziertem Mesenchym (BELSKY und TOOLE 1983).

Prüfung der Unbedenklichkeit der ermittelten Ozonierungsstärke und Einwirkzeit im Prototyp

Für die Untersuchungen, die im konzipierten **Prototyp** stattfanden, richtete sich die Wahl der Parameter zusätzlich zur Unbedenklichkeit für den sich entwickelnden Embryo auch nach den mikrobiologischen Ergebnissen und den technischen Gegebenheiten der Kooperationspartner. Unter Labormaßstäben konnte gezeigt werden, dass eine *in ovo*-Begasung mit einer Ozonkonzentration von 1% und einer EWZ von 2 h keinen embryotoxischen Effekt auf die Entwicklung des Hühnchens besitzt. Darüber hinaus waren die auf der Schalenoberfläche befindlichen Keime nach der Anwendung

dieser Parameterkombination auf ein nicht detektierbares Maß inaktiviert und auch nach der Anreicherung ergab sich, dass es zu einer 100%igen Reduktion der Ausgangskeimzahl gekommen war (FERNANDEZ 2007). Die Anwendung dieser Parameterkombination von 1%/2h im Prototyp war aus technischen Gründen nicht möglich, da der zur Verfügung stehende Generator die Konzentration von 1% nicht erzeugen konnte. Dennoch sollten Untersuchungen zur Auswirkung auf die Entwicklung mit der höchstmöglich zu erzeugenden Konzentration stattfinden. So wurden zwei Untersuchungen mit 0,7% und einer EWZ von 2 h im Prototyp durchgeführt. Beide Testreihen konnten die vorher gewonnenen Ergebnisse verifizieren. Bei einer niedrigen Ozonkonzentration von 0,7% Ozonkonzentration in Kombination mit einer EWZ von 2 h zeigte sich für Ozon kein embryotoxisches Potential und es ist kein negativer Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen zu erwarten. Die beiden durchgeführten Versuchsreihen erbrachten jeweils eine Überlebensrate von 90% und 100% und auch die morphologischen und histologischen Untersuchungen blieben ohne Befund. Somit stellt die *in ovo*-Begasung mit Ozon auf Grund der Ergebnisse eine viel versprechende Alternative zur bisher üblichen gesundheitlich bedenklichen Formalinbegasung dar. Vorschläge für eine großtechnische Lösung, die den Ansprüchen nach Unbedenklichkeit für den Embryo, mikrobiologisch negativen Ergebnissen und Wirtschaftlichkeit genügen, wurden im Verlauf des Projektes gemacht.

Untersuchung zur Auswirkung auf die Morphologie des Hühnerembryos bei Begasung während der Bebrütung

Das Ziel der Untersuchungen zur Phasenspezifität war die Ermittlung eines potentiell embryotoxischen Potenzials während der kritischen Zeitfenster der Organogenese nach hohen Ozonkonzentrationen und hoher EWZ. Diese Kombination beider Parameter ergab in den Versuchen zur *in-ovo* Begasung am BT 0 einen hochgradig schädigenden Einfluss auf die ÜLR der Embryonen. Die Manifestation eines embryotoxischen Potentials ist abhängig von der sog. kritischen Periode und der Sensitivität des Systems zum Zeitpunkt der Applikation, der Dosis und auch vom Vorhandensein eines metabolischen Systems (JELINEK 1982). Bei den durchgeführten Untersuchungen fand die Applikation des Ozons an drei Bebrütungstagen, BT 3, 4 und 5, statt. Anschließend wurde die Bebrütung bis zum 6. bzw. 8. BT fortgesetzt. Die Wahl des Applikationszeitpunktes erfolgte auf Grund der Tatsache, dass zu diesem Zeitpunkt die Organogenese des sich entwickelnden Embryos stattfindet und diese Phase der Ausdifferenzierung als sehr sensitiv für einwirkende Noxen gilt. In dieser sogenannten „kritischen Periode“ der Morphogenese der Organe des Hühnerembryos zwischen dem BT 3 und 5 haben die Applikationen von verschiedenen chemischen Substanzen zu einem weiten Spektrum an Missbildungen oder zur Embryotoxizität geführt. Dieses Vorgehen stellt so ein verlässliches Modell zur Detektierung eines teratogenen oder embryotoxischen Potenzials dar (PETERKA 2002). Darüber hinaus ist auch bekannt, dass es innerhalb dieser kritischen Periode zu

einer zeitlich unterschiedlichen Sensibilität gegenüber der Noxe kommt, der Phasenspezifität. Aus diesem Grund erfolgte die Ozonierung jeweils an den BT 3, 4 und 5. Es wurden folgende Daten erhoben: morphologische Entwicklung der Embryonen sowie des Herzens und die histologische Entwicklung von Herz, Leber und Niere.

Die gewählten **Applikationszeitpunkte** BT 3, 4 und 5 stellen, wie bereits erwähnt eine kritische Periode dar, die nach der Furchung mit anschließender Keimblattbildung (Gastrulation) auftritt und durch die Entstehung von Organen charakterisiert ist. Die Organogenese schließt diffizile und hochkomplexe Reife- und Differenzierungsmechanismen ein, die der Zelle eine gewisse Sensibilität verleiht. In der Literatur wird übereinstimmend angegeben, dass am Ende des BT 5 die Organogenese abgeschlossen ist. Die vermehrte Empfindlichkeit der Embryonen in dieser Zeit spiegelt sich auch in einer erhöhten Mortalitätsrate während der ersten Phase der kritischen Periode am BT 4 wider (ROMANOFF und ROMANOFF 1972). Die zwei weiteren kritischen Phasen werden von den Autoren mit dem BT 11 und dem BT 19 angegeben. Die *in-ovo* Begasung an drei Bebrütungstagen erlaubte eine umfassendere Aussage zur Phasenspezifität, da die Wirkung an verschiedenen Tagen unterschiedlich stark sein kann, wie PETERKA et al. (2002) in einem Versuch mit Cisplatin-Procaïn-Komplex am Hühnerembryo bestätigen konnte. Dabei erfolgte bei zehn Tieren die Applikation des Cisplatin-Procaïn-Komplexes in einer Dosierung von 3 µg jeweils am BT 3, 4 und 5 in das Amnion und die Bebrütung wurde bis zum BT 9 fortgesetzt. Die Embryotoxizität nach der Applikation am BT 3 war am höchsten. Hier starben alle Tiere ab, während nach der Applikation am BT 4 bereits 7 Tiere überlebten und nach der Behandlung am BT 5 am Untersuchungstag BT 9 alle Tiere vital waren. Unsere Untersuchungen ergaben keinen Anhaltspunkt für eine solche Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt innerhalb dieser kritischen Periode. In beiden Untersuchungsreihen zeigte sich an allen drei Bruttagen an denen begast wurde in der Folge eine hohe Embryoletalität. Missbildungen konnten nicht dokumentiert werden. Die doppelte Kopfanlage eines Kontrollembryos kann durch das Ausbleiben einer Ozonbegasung als Spontanmissbildung gewertet werden. Kritisch muss das Ergebnis des Versuches BT 3 ET 6 betrachtet werden, da hier bereits acht der 30 Embryonen als vor der Ozonierung am BT 3 verstorben eingestuft wurden bzw. den Entwicklungsstand des BT 3 nicht erreicht haben. Ein Grund für dieses Ergebnis kann das nicht zeitliche Konform Gehen von physiologischen und chronologischen Alter sein (SCHNEIDER und NORTON 1978), das zu einer zu frühen Einordnung des abgestorbenen Embryonen auf Grund seiner Morphologie geführt hat. Dafür spricht die sehr gute Entwicklungsrate von 100% der Kontrolltiere dieses Versuchs und schließt einen anderen äußeren negativen Einfluss aus. Außerdem liegt die normale Schlupfrate dieser Rasse zwischen 80 und 83%, die somit selbst ohne anschließende Einwirkung einer Noxe nicht mehr erreicht worden wäre. Dennoch untermauert auch dieses Ergebnis die Tatsache, dass die Tiere die den Begasungszeitpunkt morphologisch erreicht haben, nach dem Einwirken der Noxe verstarben.

Die **Applikation des Ozons** erfolgte nach den gleichen Versuchsbedingungen wie vor der Bebrütung. Somit muss man den Einfluss der Eischale als Barriere in Betracht ziehen. Wie bereits früher angeführt, kann man für Ozon auf Grund seiner ähnlichen molekularen Struktur zu Sauerstoff und Kohlendioxid von einer guten Diffusion in das Ei (WHISTLER und SHELDON 1989c) und somit von einem indirekten Kontakt mit dem sich entwickelnden Embryo ausgehen. Bei teratogenen Studien erfolgt die Applikation der zu untersuchenden Stoffgruppe meist durch Eröffnung des Eies und Injektionen in den Dottersack bzw. das Amnion. Somit ist auch hier ein direkterer Kontakt zwischen Embryo und Prüfstoff garantiert. Die effektiv wirkende Dosis Ozongas im Ei kann mit der durchgeführten Applikationsart nicht angegeben werden. Dies ist aber laut WALKER (1977) auch bei den beiden anderen genannten direkten Applikationsarten immer ein Kritikpunkt.

Der **Entnahmezeitpunkt** wurde anhand der angewandten Untersuchungstechniken - der Lichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie - gewählt und mit Angaben aus Artikeln zu teratologischen Studien am Hühnerei verglichen. So wählte MÄNNER et al. (2003) für seine Studie nach der Applikation von Suramin während der Organogenese den BT 8 zur elektronenmikroskopischen Untersuchung, PETERKA (2002) nach Cisplatinapplikation den BT 9. Die Größe der Embryonen erlaubte zu diesem Zeitpunkt eine gute lichtmikroskopische Betrachtung der Gesamtmorphologie und nach Abtrennen des Kopfes eine elektronenmikroskopische Aufbereitung und Beurteilung von Kopf und Rumpf. Außerdem liegt zwischen der Applikation der Noxe und der Untersuchung ausreichend Zeit, um eine Auswirkung auf die Morphologie sichtbar werden zu lassen. Die Wahl des BT 6 sollte es ermöglichen, den gesamten Embryo mittels Paraffineinbettung und Hämatoxylin-Eosin-Färbung in Sagittalschnitten zu beurteilen. Dies sollte die Möglichkeit bieten, den Einfluss von Ozon auf die Organentwicklung korrespondierend mit der äußeren morphologischen Entwicklung und der Herzentwicklung darzustellen.

Die ermittelten **Überlebensraten** der Versuche 5%/ 1h an den BT 3, 4 oder 5 führten zu geringen Überlebensraten von 3 bis maximal 10%. In einer von KAVLOCK et al. (1978) durchgeführten Versuchsreihe, in der trächtige Ratten während der Organogenese zwischen dem 6. und dem 15. Gestationstag zeitlich variierend verschiedenen Dosen Ozon ausgesetzt waren, konnten bei Applikation von 1,49 ppm (entspricht 0,1%) von Tag 9-12 eine erhöhte Resorptionsrate (50,4%) der Feten im Vergleich zu den Kontrollen (8,9%) nachgewiesen werden. Zwar ist die Dosis mit 1,49 ppm sehr gering im Vergleich mit der von uns angewandten Konzentration, der Applikationszeitraum wesentlich länger und die Plazenta stellt eine andere Diffusionsbarriere dar als die Eischale, eine Tendenz kann aber durchaus abgelesen werden. Frühe Studien, bei denen eine Formaldehydbegasung während der Bebrütung stattfand, führten zu der Empfehlung, diese nicht zwischen 24 h und 84 h (GWATKIN 1926 und 1928, BUSCHNELL et al. 1929) bzw. 24 h und 96 h (MARCELLUS et al 1930) nach Beginn dieser anzuwenden. Andere Autoren geben die kritische Periode für die Begasung mit Formaldehyd sogar bis zur 120. h (BT 5) (LANCASTER et al. 1954) oder zwischen dem BT 3 und

BT 9 (HARRY und BINSTED 1961) an. Die Ergebnisse unserer Untersuchung lassen die Vermutung zu dass der Zeitraum vom BT 3 bis BT 5 ebenfalls eine kritische Periode für Ozon darstellt.

Die ozonierten Tiere der Rattenstudie von KAVLOCK et al (1978) wiesen eine geringere Gewichtsentwicklung als die nicht-ozonierten auf. Dies zeigte sich auch in den von uns durchgeführten Versuchsreihen sowohl für die **Gewichts-** als auch für die **Längenentwicklung** bis zum BT 6 bzw. BT 8. Mögliche Gründe für das verminderte Wachstum der Ratten machten KAVLOCK et al. (1978) nicht. Ebenfalls eine geringere Gewichtsentwicklung ohne signifikanten Abweichungen zu den Kontrollen konnten bei Studien an Hühnerembryonen festgestellt werden, wenn sie nach 27 h Bebrütung unterschiedlichen Dosen Ethanol ausgesetzt waren und am BT 14 untersucht wurden (LAWRENCE und YODER 2000). Die Autoren vermuten, dass Ethanol neben den Zellen der Neuralrinne, an denen sie nachweislich Apoptosevorgänge auslösen, zu einem gewissen Grad alle Körperzellen beeinflussen und es so auch zur geringeren Masseentwicklung kommt. Der häufig beobachtete wachstumsinhibierende Effekt scheint ein ubiquitärer Prozess verschiedener chemischer Noxen zu sein und kann durch unsere Untersuchungen auch für die Noxe Ozon geltend gemacht werden. Anders als bei der Behandlung vor der Bebrütung muss man auch den durch die Ozonierung während der embryonalen Entwicklung kurzzeitig wirkenden Sauerstoffmangel als Einflussfaktor auf die ÜLR und die Gewichts- und Längenentwicklung in Betracht ziehen. Die Sauerstoffversorgung über die Leitfähigkeit der Eierschale ist an den BT 3, 4 und 5 in einer normoxischen Umgebung gerade noch ausreichend, wird aber insuffizient, kommt es zu einer Hypoxie (MEUER und BAUMANN 1988). Die Funktionsfähigkeit der CAM als sauerstoffversorgende Struktur ist erst ab dem BT 6 vollständig erreicht. Es zeigte sich in der Untersuchung von ALTIMIRAS und PHU (2000) eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber einer Hypoxie, abhängig vom Zeitpunkt des Einwirkens. Die Mortalitätsrate bei der Applikation eines verringerten Sauerstoffpartialdruckes von 10% über 6 h am BT 4 im Vergleich zu denen nach der Behandlung am BT 2 und 3 war signifikant höher. Dennoch wiesen auch sie nach, dass die überlebenden Tiere, trotz dieser erhöhten Sensitivität, bei der Untersuchung am BT 9 keine Unterschiede in ihrer morphologischen Entwicklung aufwiesen im Vergleich zu den Kontrollen. Auch unserer Ozonapplikation am BT 4 resultierte in einer hohen Embryonensterblichkeit und es stellt sich die Frage nach dem eventuell synergistischen Einfluss der erhöhten Sensitivität gegenüber einer Hypoxie und des Ozons auf die ÜLR. Im Vergleich mit der genannten Studie ist der mögliche Abfall des Sauerstoffpartialdruckes in den von uns durchgeführten Versuchen mit 1 h EWZ sehr gering und auch an den anderen beiden von uns gewählten Applikationstagen BT 3 und BT 5 ist die Mortalitätsrate sehr hoch, so dass man davon ausgehen kann, dass der Einfluss des Ozons auf die ÜLR die größere Rolle spielt. Gestützt wird dies durch die Ergebnisse von ALTIMIRAS und PHU (2000), deren Studie erwies, dass eine akute Hypoxie während des BT 2 und BT 3 keine Auswirkungen auf die Entwicklung hat und auch das Wirken eines

verminderten Sauerstoffpartialdruckes über 2 h und 4 h am BT 4 keinen signifikanten Anstieg der Mortalitätsrate im Vergleich mit den Kontrollen nach sich zieht.

Zu vergleichbaren Ergebnissen bezüglich der Frage nach der **Teratogenität von Ozon** kommt die Studie von KAVLOCK et al. (1978) an Ratten. Es waren bei der Applikation während der Organogenese bei Ratten keine teratogenen Effekte nachweisbar. Für diese gibt es auch nach unseren Untersuchungen am embryonierten Hühnerei keinen Anhaltspunkt, obwohl bei einem ozonierten Tier, das bis zum BT 8 überlebte, eine von der Altersnorm abweichende Körper- und Kopfmorphologie feststellbar war. Die noch nicht abgeschlossene Schnabelbildung beruht nicht auf einer fazialen Spaltbildung, sondern ist auf eine frühere Entwicklungsperiode mit retardiertem Wachstum zurückzuführen, da auch die Gewichtsentwicklung stark von dem zweiten überlebenden ozonierten Tier und den Kontrolltieren abweicht. Dieser Befund kann als Hinweis für die bereits vermutete Beeinflussung aller Körperzellen von Ozon gesehen werden, wie es auch für Ethanol diskutiert wird (LAWRENCE und YODER 2000). Bei den weiteren überlebenden Tieren beider Versuchsreihen wurden keine Missbildungen festgestellt. So kann man von einer hohen Embryoletalität von Ozon ausgehen, wie es auch für Ratten gezeigt werden konnte (KAVLOCK et al. 1978). Die von VENINGA (1967) beschriebenen viszeralen Anomalien bei Mäusen nach Ozonapplikation waren in den Hühnerversuchen dagegen nicht aufzuzeigen.

Die besondere Betrachtung der Herzentwicklung der ozonbegasteten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren gründete in der Tatsache, dass teratogene Studien mit embryonierten Hühnereiern anderer Autoren deutliche Missbildungen am Herz nachweisen konnten. Untersuchungen mit Suramin ergaben kongenitale Missbildungen, insbesondere an den Gefäßabgängen des Herzens (MÄNNER et al. 2003). Konkret kam es zu Abweichungen der Verzweigungen der Aortenbogenarterien bis hin zum vollständigen Verlust der rechten Arteria brachiocephalica sowie zur teilweisen oder vollständigen Verlagerung der rechten Vorhofanlage links des Truncus arteriosus. Die Rückbildung des Mesocardium ventrale unterblieb. Die von uns durchgeführten Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf Missbildungen im Herzbereich nach der Applikation von Ozon. Es konnten in der ersten Versuchsreihe Abweichungen der Herzsilhouette an zwei überlebenden begasteten Tieren festgestellt werden. So ist das Herz des einen Versuchstieres am BT 8 stumpfkegelig, da der normalerweise die Herzspitze formende linke Ventrikel vergrößert erschien. Diese morphologischen Veränderungen scheinen aber zu keinem letalen Funktionsverlust geführt zu haben, denn das Tier wies am BT 8 eindeutige Vitalparameter auf. Auf histologischer Ebene ergaben sich jedoch bei den nach der Begasung überlebenden Tieren keine Anhaltspunkte für strukturelle Veränderungen der Herzentwicklung. Dies gilt auch für die Embryonen, die nach der Begasung abstarben. Diese Erkenntnis stützt die Theorie eines **Schwarz-Weiß-Prinzips** bzw. eines **Alles-oder-Nichts-Prinzips** der Ozonwirkung. Die aufgetretene Schädigung durch Ozon ist entweder so stark, dass eine weitere Entwicklung der Embryonen nicht möglich ist oder es erfolgt eine normale Entwicklung. Aufgetretene

strukturelle Veränderungen waren mit den von uns angewandten bildgebenden Verfahren nicht nachweisbar. Die negative Wirkung von Ozon auf molekulargenetischer Ebene ist durch die Untersuchungen von RUPP (2006) gezeigt worden und kann auch hier als auslösender Faktor für den Entwicklungsstillstand vermutet werden. Über die Gründe für das Überleben einzelner Tiere nach der Begasung mit einer hohen Ozonkonzentration von 5% und einer EWZ von 1 h können auch bei der Applikation während der Bebrütung nur vorsichtige Vermutungen angestellt werden. Das optimale Zusammentreffen von Resistenz- und Kompensationsmechanismen sowie die eventuell hohe Funktionsfähigkeit des antioxidativen Stoffwechsels sind sicher wichtige Bausteine für das Überleben der Tiere.

Resümee

Die Applikation einer **hohen Dosis** Ozon während der Organogenese des Hühnerembryonen hat - wie auch die Applikation vor dem Beginn der Bebrütung - eine **hohe Embryoletalität** zur Folge, es zeigt sich aber kein teratogenes Potenzial. Es konnte somit eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Ozon in diesem Zeitraum nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigt die Unabhängigkeit der Mortalitätsrate vom Applikationszeitpunkt, dass es keinen Unterschied in der Wirkung von Ozon auf den sich entwickelnden Embryo innerhalb der kritischen Periode gibt.

Die Frage, ob die **Ozonbegasung** eine **alternative Desinfektionsmethode** für Bruteier darstellt, kann deutlich positiv beantwortet werden. Dabei spielt nicht nur seine relativ einfache Erzeugung und seine deutlich geringere Toxizität im Vergleich zur herkömmlich verwendeten Formalinbegasung eine Rolle, sondern auch die sehr schnelle und sehr gute bakterizide Wirkung mit Konzentrationen, die keinen negativen Einfluss auf das anschließend zu bebrütende Ei haben. Die Kombination einer Konzentration von 1% und einer EWZ von 2 h erreicht dieses Ziel, ohne dass es dabei zu maßgeblichen Veränderungen der Eiinhaltsstoffe und zur negativen Beeinflussung der anschließenden Embryonalentwicklung kommt. Die Etablierung dieses Verfahrens stellt in der Zukunft eine technische und wirtschaftliche Herausforderung dar, ist aber eine sehr gute Möglichkeit die Sicherheit des gesundheitlichen Verbraucherschutzes innerhalb der Erzeugung von Bruteiern weiter zu erhöhen.

6 Zusammenfassung

Thiele, Margrit

Untersuchungen zur Embryotoxizität von Ozon nach einer *in ovo*-Begasung beim Huhn

Veterinär-Anatomisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im März 2011

91 Seiten, 70 Abbildungen, 5 Tabellen, 161 Literaturstellen, 24 Anhänge

Schlüsselwörter: Ozon, Begasung, Embryotoxizität, Teratogenität, Hühnerembryonen, Bruteier

Die derzeit angewendete Formalinbegasung von Bruteiern zur Keimreduktion stellt ein wichtiges Mittel zum Schutz des Verbrauchers vor dem Eintrag der Salmonellose aus der Geflügelindustrie in die Lebensmittelkette dar. Jedoch verlangt sein kanzerogenes Potenzial die Suche nach einer ebenso effektiven und einfach zu praktizierenden, aber weniger gesundheitlich bedenklichen alternativen Methode. In dieser Arbeit wurde die Eignung einer ***in ovo*-Ozonbegasung zur Bruteidesinfektion** hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Embryonalentwicklung untersucht.

Dafür wurden befruchtete Eier vor ihrem Einsatz in den Brüter mit unterschiedlichen Ozonkonzentrationen zwischen 0,5% bis >5,0% (wt/ wt O₃ in O₂) bei einer relativen Luftfeuchte von 70% in einer Laborkammer begast. Die verwendeten Ozonkonzentrationen wurden dabei in drei Konzentrationsgruppen eingeteilt: hoch (2,8% bis 5,0%), mittel (1,1% bis 2,5%) und niedrig (0,5% bis 1,0%). Nach Erreichen der Zielkonzentration blieben die Eier für eine definierte Einwirkzeit (EWZ) zwischen 0 bis 24 h in der Kammer. Am Bruttag (BT) 18, 19 oder 20 wurden die Überlebensrate (ÜLR), Gewicht und Länge erhoben sowie histologische Untersuchungen der Organe Herz, Leber, Milz und Niere vorgenommen. Bei vier Versuchen erfolgte zusätzlich die Untersuchung am BT 6 und BT 12. Insgesamt wurden 13 Versuchsreihen mit Begasungen in der Laborkammer in den drei genannten Konzentrationsgruppen durchgeführt.

Des Weiteren sollte die Übertragbarkeit der ermittelten Ergebnisse auf eine großtechnische Lösung, durch die Anwendung in einer projektintern entwickelten Prototyp-Kammer überprüft werden. Die Konzipierung dieses Prototyps folgte den technischen Gegebenheiten unter Einbeziehung der ermittelten Ergebnisse zur Embryotoxizität, zur Effektivität der Keimreduktion sowie der Veränderung der Eiinhaltsstoffe. Im Prototyp wurde daher die Begasungskonzentration von 0,7% Ozon bei einer EWZ von 2 h angewendet und in 2 Versuchsreihen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit und die morphologische Entwicklung getestet.

Um zusätzlich eine Aussage treffen zu können, welche Wirkung eine hohe Ozonkonzentration bei der Applikation während der Bebrütung zur Folge hat, wurde in zwei weiteren Versuchsreihen jeweils am

BT 3, 4 und 5 eine Ozondosis von 5,0% in Kombination mit 1 h EWZ appliziert. Nach der Entnahme der Embryonen am BT 6 bzw. BT 8 erfolgte die morphologische Untersuchung.

Aus der vorliegenden Arbeit wird zusammenfassend geschlussfolgert:

- ✓ Ozon besitzt einen dosisabhängigen Effekt auf die ÜLR: je höher die Dosis, desto geringer die Überlebensrate. Bei niedrigen Ozonkonzentrationen zwischen 0,5% und 1,0% kommt es zu ÜLR von 90% und 100%.
- ✓ Die Einwirkzeit stellt einen wichtigen Einflussfaktor auf die Überlebensrate dar. Eine Kombination einer hohen Ozondosis mit langer EWZ hat eine höhere Embryomortalität zur Folge, als eine hohe Ozondosis ohne EWZ. Eine erhöhte Mortalitätsrate zeigt sich auch bei der Kombination einer mittleren Ozondosis mit einer langen EWZ. Keinen Einfluss zeigt sie bei der Kombination mit einer niedrigen Ozonkonzentration.
- ✓ Ozonierte Embryonen zeigen dosisabhängig eine geringere Längen- oder Gewichtsentwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikante Gewichts- und Längenunterschiede lagen nur vereinzelt bei der Begasung mit hoher Ozonkonzentration vor.
- ✓ Pathohistologische Befunde an Organen, die mit einer Ozonbegasung in Zusammenhang gebracht werden können, konnten nicht erhoben werden.
- ✓ Die Versuche zur Begasung während der Organogenese wiesen nicht auf ein teratogenes Potenzial von Ozon hin. Korrespondierend mit den Ergebnissen der Begasung am BT 0 zeigte sich ebenfalls eine deutliche Embryotoxizität.
- ✓ Die Wirkung von Ozon folgt einem **Alles-oder-Nichts-Prinzip**: entweder die Schädigung ist so stark, dass es zu keiner Entwicklung mehr kommt, oder aber der überlebende Embryo bzw. Fetus zeigt ein phänotypisch normales Aussehen.
- ✓ Mit den vorgestellten Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass bei einer *in ovo*-Begasung von befruchteten Hühnereiern am Bruttag 0 mit einer niedrigen Ozonkonzentration von 0,5% bis 1,0% in Kombination mit einer mittleren und geringen EWZ **keine teratogenen oder embryotoxischen Veränderungen** zu erwarten sind.
- ✓ Aus diesen Befunden ergibt sich ein unbedenklicher Einsatz von Ozon als alternative Methode zur Bruteidesinfektion. Die Voraussetzung dafür ist, dass die großtechnische Lösung die Anwendung von 1,0% Ozonkonzentration in Kombination mit 2 h EWZ ermöglicht, um eine sehr gute ÜLR, Entwicklung und eine 100%ige Inaktivierung des in Legehennenbeständen vorherrschenden Serovars *Salmonella* Enteritidis zu gewährleisten.

7 Summary

Thiele, Margrit

Investigations on embryotoxicity of ozone to the chick embryo while *in ovo* application

Institute of Veterinary Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in March 2011

91 pages, 70 figures, 5 tables, 161 references, 24 appendices

Key words: Ozone, fumigation, embryotoxicity, teratogenicity, chick embryos, hatching eggs

The current hatching egg disinfection by formaldehyde fumigation is an important issue of consumerism against poultry borne salmonellosis. Because of the carcinogenicity of formaldehyde there is the need for a comparably effective and feasible alternative method without adverse effects for public health. The aim of the present work was to evaluate the adaptability of **ozone fumigation for hatching eggs disinfection** according to its impact on embryonic development.

For this purpose before incubation fertilized eggs were fumigated with ozone in a lab chamber in relative humidity of 70%. Ozone was applied in concentrations differing between 0.5% and >5.0% (wt/wt O₃ in O₂) which were classified in three concentration groups high: (>5.0% - 2.8%, medium: (2.5% - 1.1%) and low: (1.0% - 0.5%) After reaching the required concentration the eggs were left in the chamber for a defined time period (exposure time) of 0 to 24 hours. Subsequently the eggs were transferred to an incubator. On day 18, 19 or 20 of incubation the eggs were opened and the embryos were examined. Investigated parameters were weight and body-length and histological examination of heart, liver, spleen and kidney. In four trials, additionally the respective data were recorded on day 6 and 12 of incubation. Altogether in the lab chamber 13 test series within the three concentration groups combined with different exposure times were performed.

Furthermore the ascertained data assignability was tested in a prototype chamber which had been developed in the course of the project. The chamber prototype was designed according to technical requirements, taken account of ascertained data for efficiency of germ reduction, the influence on egg constituent and the results regarding embryotoxicity and teratogenicity. Thus, a fumigation concentration of 0.7% ozone and an exposure time of two hours were chosen for the prototype. Both test series performed in the prototype achieved survival rates of 90% to 100%.

In order to estimate the consistency of ozone application in high doses during incubation, two further test series were proceeded with application of 5.0% ozone and exposure time of one hour on each of incubation days 3, 4 and 5. Subsequently incubation was sustained until incubation day 8 (first test series) or day 6 (second test series), respectively. After sampling embryos were morphologically

examined. The embryo mortality was very high while no teratogenic effects were observed which is in accordance with the previously achieved results after fumigation on day 0 of incubation.

The following conclusions can be drawn from the present work:

- ✓ Ozone has a dose-dependent effect on the survival rate of chick embryos: The higher the applied ozone concentration the higher the embryo mortality. Low Ozone concentrations between 0.5% and 1.0% have no impact on survival rate compared to unfumigated controls.
- ✓ The exposure time is an important parameter biasing mortality. Combinations of high doses of ozone with long exposure time result in higher embryo mortality than high doses applied with no exposure time.
- ✓ Ozone treated embryos generally show a retarded length and weight development in comparison to control embryos. Significant differences were observed only infrequently after fumigation with high ozone concentrations.
- ✓ In all investigated embryos there were no pathohistological findings which could be associated with ozone treatment.
- ✓ The effect of ozone follows an **all-or-none-principle**: either the impairment leads to an absence of development (death) or the surviving embryo respectively fetus shows a phenotypically normal appearance. By the presented investigations it could be demonstrated that after *in ovo* fumigation of fertilized eggs on day 0 of incubation no teratogenic or embryotoxic impact is to be anticipated if a low ozone concentration of 0.5% to 1.0% in combination with a low to medium exposure time is applied.
- ✓ Trials investigating the effect of ozone during organogenesis did not indicate a teratogenic potential of ozone but confirmed the previously identified embryotoxicity
- ✓ Fumigation with ozone in low concentrations between 0.5% - 1.0% represents an alternative method of hatching egg disinfection since there is **no embryotoxicity or teratogenicity** to be assumed. In order to fulfil the requirements of high sr, normal development and complete inactivation of *S. Enteritidis* the industrial-scale engineering solution has to guarantee the application of at least 1.0% ozone in combination with 1 h exposure time.

8 Literaturverzeichnis

Ackerman RA, Rahn H. In vivo O₂ and water vapour permeability of the hen's eggshell during early development. *Respir Physiol.* 1981 45(1):1-8.

Altimiras J, Phu L. Lack of physiological plasticity in the early chicken embryo exposed to acute hypoxia. *J Exp Zool.* 2000;286(5):450-6.

Ancel P. La chimiotérogénèse. Doin, Paris ; 1950.

Anonym. Health effects of outdoor air pollution. Committee of the environmental and occupational health assembly of the American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Jan;153(1):3-50.

Arora KL, Kosin IL. A heritable difference in the resistance of turkey blastoderms to prolonged preincubation storage - cytological evidence. *Poult Sci.* 1968 Nov;47(6):2000-2.

Braun P. Abschlussbericht zum Forschungsprojekt „Entwicklung einer technischen Verfahrenslösung zur nachhaltigen Keimreduktion, insbesondere von Zoonoseerregern, bei Hühnereiern mittels ozonhaltiger Medien – ein Beitrag zur Erhöhung der Produktqualität und des Verbraucherschutzes“. Leipzig; 2005.

Bailey PS. The reactions of ozone with organic compounds. *Chem Rev.* 1957;58:952-1010.

Baitsell GA. Extracellular matrix fibrils and cell contacts in chick embryo. *Quart J Microscop Sci.* 1925;69:571-89.

Baker JR, Balch DA. A study of the organic material of hen's-egg shell. *Biochem J.* 1962 Feb;82:352-61.

Balch DA, Cooke RA. A study of composition of hen's egg shell membranes. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophys.* 1970;10:13-25.

Belsky E, Toole BP. Hyaluronate and hyaluronidase in the developing chick embryo kidney. *Cell Differ.* 1983;12:61-6.

Benoit J. Organes Uro-génitaux. In: Grassé PP, Hrsg. *Traité de Zoologie.* Paris: Masson et Cie; 1950. p. 341-77.

Bloom SE, Muscarella DE, Lee MY, Rachlinski M. Cell death in the avian blastoderm: resistance to stress-induced apoptosis and expression of anti-apoptotic genes. *Cell Death Differ.* 1998 Jun;5(6):529-38.

Brady JE, Humiston GE. General chemistry principles and structures. 2. Aufl. New York: John Wiley and Sons; 1978.

Bruce J, Johnson AL. The bacterial flora of the unhatched eggs. *Br. Poult. Sci.* 1978;19:681-9.

Burggren WW. Cardiac design in lower vertebrates: what can phylogeny reveal about ontogeny? *Experientia*. 1988 Dec 1;44(11-12):919-30.

Burton GW, Ingold KU. Vitamin-E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc Chem Res.* 1986;19:194-201.

Chan T, Burggren W. Hypoxic incubation creates differential morphological effects during specific developmental critical windows in the embryo of the chicken (*Gallus gallus*). *Respir Physiol Neurobiol.* 2005 Feb 15;145(2-3):251-63.

Chandra M, Surendra K, Kapoor RK, Ghatak A, Kaur G, Pandey NR, et al. Oxidant stress mechanisms in heart failure. *Boll Chim Farm.* 2000;139(3):149-52.

Chang YH, Sheldon BW. Application of ozone with physical waste water treatments to recondition poultry process water. *Poult Sci.* 1989;68:1078-87.

Ciotto C, Arangi I. How do avian embryos breathe? Oxygen transport in the blood of early chick embryos. *Comp Biochem Physiol.* 1989;94(4):607-13.

Clegg DJ. The hen egg in toxicity and teratogenicity studies. *Food Cosmet Toxicol.* 1964;2:717-8.

Danchakoff V. Equivalence of different hematopoietic anlagen by method of stimulation of their stem cells. *Am J Anat.* 1916;20:255-308.

Davis CL. The cardiac jelly of the chick embryo. *Anat Record.* 1924;27:201-2.

DeLong MJ. Apoptosis: a modulator of cellular homeostasis and disease states. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Apr 15;842:82-90.

Dorn P. Desinfektionsmöglichkeiten von Bruteiern. *Tierärztliche Umsch.* 1959;14:74-6.

Dzialowski EM, von Plettenberg D, Elmonoufy NA, Burggren WW. Chronic hypoxia alters the physiological and morphological trajectories of developing chicken embryos. *Comp Biochem Physiol. A Mol Integr Physiol.* 2002;131(4):713-24.

Elias H, Bengelsdorf H. The structure of the liver of vertebrates. *Acta Anat.* 1952;14(4):297-337.

Erben HK. Ultrastruktur und Mineralisation rezenter und fossiler Eischalen bei Vögeln und Reptilien. *Biom mineralisation* 1970;1:1-66.

Etches RJ, Clark ME, Zajchowski L, Speksnijder G, Verrinder Gibbins AM, Kino K, et al. Manipulation of blastodermal cells. *Poult Sci.* 1997 Aug;76(8):1075-83.

Eyal-Giladi H, Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. Dev Biol. 1976 Apr;49(2):321-37.

Fernandez-Castro, N. Untersuchung zur Inaktivierung von *Salmonella enteritidis* auf der Schale von Bruteiern mit Ozongas. [Dissertation med. vet] Leipzig: Univ. Leipzig; 2007.

Fisher M, Schoenwolf GC. The use of early chick embryos in experimental embryology and teratology: improvements in standard procedures. Teratology. 1983 Feb;27(1):65-72.

Freeman BM, Vince MA. Development of the avian embryo. London: Chapman and Hall; 1974.

Gaal T, Mezes M, Noble RC, Dixon J, Speake BK. Development of antioxidant capacity in tissues of the chick embryo. Comp Biochem Physiol. 1995;112B:711-6.

Giese AC, Christenser F. Effects of Ozone on organisms. Physiol Zool. 1954;27:101-15.

Giuassani DA, Salinas CE, Villena M, Blanco CE. The role of oxygen in prenatal growth : studies in the chick embryo. J Physiol. 2007;585(3):911-7.

Goerrtler K. Der "teratologische Grundversuch" am bebrüteten Hühnerkeim, seine Möglichkeiten und Grenzen. Klin Wschr. 1962;40:809.

Goldstein BD, McDonagh EM. Effect of ozone on cell membrane protein fluorescence. I. In vitro studies utilizing the red cell membrane. Environ Res. 1975 Apr;9(2):179-86.

Gores GJ, Herman B, Lemasters JJ. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. Hepatology 1990 Apr;11(4):690-8.

Graham HN, Struder VV, Gurkin, M. inventors; Conversion of green tea using ozone. 1969.

Guzel-Seydim Z, Bever PI, Greene AK. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. Food Microbiol. 2004 Aug;21(4):475-9.

Gwatkin R. Some experiments on the disinfection of eggs and incubators. Rep Ontario Vet Coll. 1926:58-65.

Gwatkin, R. The disinfection of incubators with formaldehyde during hatching. Rep Ontario Vet Coll. 1928:53-5.

Habermann B. Abschlussbericht zum Forschungsprojekt „Entwicklung einer technischen Verfahrenslösung zur nachhaltigen Keimreduktion, insbesondere von Zoonoseerregern, bei Hühnereiern mittels ozonhaltiger Medien – ein Beitrag zur Erhöhung der Produktqualität und des Verbraucherschutzes“. Berlin; 2005.

Hall ED, Andrus PK, Oostveen JA, Fleck TJ, Gurney ME. Relationship of oxygen radical-induced lipid peroxidative damage to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *J Neurosci Res.* 1998 1;53(1):66-77.

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Morph.* 1951;88:49-92.

Hamilton R, McNeill G, Pradley F, Pierce J. Effects of tocopherols, ascorbyl, palmitate and lecithin on auto oxidation of fish oil. *J Am Chem Soc.* 1998;75:813-22.

Harry EG, Binstead JA. Studies on disinfection of eggs and incubators: V. The toxicity of formaldehyde to the developing embryo. *Br Vet J.* 1961;117:532-9.

Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin Sci. (Lond.)* 1992;83(6):639-48.

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993 22;75(2):241-51.

Hodges RD. The ultrastructure of the liver parenchyma of the immature fowl (*Gallus domesticus*). *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1972;133(1):35-46.

Hunt MK, Marinas BJ. Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics. *Water Res.* 1999;33:2633-41.

Hübner K. Ein potentes Gas: Ozon. *Schott INFO.* 102, 10-12. 2002.

Ingold KU, Burton GW, Foster DO, Zuker M, Hughes L, Lacelle S, et al. A new vitamin E analogue more active than alpha-tocopherol in the rat curative myopathy bioassay. *FEBS Lett.* 1986 Sep 1;205(1):117-20.

Ingram M, Haines RB. Inhibition of bacterial growth by pure ozone in the presence of nutrients. *J Hyg. (Cambr.)* 1949;47:146-58.

Jelinek R. Use of chick embryo in screening for embryotoxicity. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1982;2(3-4):255-61.

Kafoury RM, Pryor WA, Squadrito GL, Salgo MG, Zou X, Friedman M. Lipid ozonation products activate phospholipases A2, C, and D. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;150(2):338-49.

Kagan VE, Serbinova EA, Forte T, Scita G, Packer L. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 1992;33(3):385-97.

Kanofsky JR, Sima P. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J Biol Chem.* 1991;266(14):9039-42.

- Kavlock R, Daston G, Grabowski CT. Studies on the developmental toxicity of ozone. I. Prenatal effects. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1979;48(1 Pt 1):19-28.
- Kayar SR, Snyder GK, Birchard GF, Black CP. Oxygen permeability of shell and membranes of chicken eggs during development. *Resp Physiol.* 1981;46:209-21.
- Keinan E, Alt A, Amir G, Bentur L, Bibi H, Shoseyov D. Natural ozone scavenger prevents asthma in sensitized rats. *Bioorg Med Chem.* 2005;13(2):557-62.
- Keller H. Über den Nachweis und die Darstellung des Eihäutchens bei Hühner- und Enteneiern. *Z Fleisch- Milchhyg.* 1940;51:43-8.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
- Kim CK, Gentile DM, Sproul OJ. Mechanism of ozone inactivation of bacteriophage f2. *Appl Environ Microbiol.* 1980;39(1):210-8.
- Kim JG, Yousef AE, Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J Food Prot.* 1999;62(9):1071-87.
- Kim JG, Yousef AE, Khadre MA. Ozone and its current and future application in the food industry. *Adv Food Nutr Res.* 2003;45:167-218.
- Kingsbury JW, Alexanderson M, Kornstein ES. The development of the liver in the chick. *Anat Rec.* 1956;124(2):165-87.
- Kogelschatz U. Advanced ozone generation. In: Stucki S, Hrsg. *Process technologies for water treatment.* New York: Plenum Press; 1988.p. 87-120.
- Kreybig Tv. Tierexperimentelle Teratologie und Arzneimittelprüfung. *Med Klin.* 1966;17:390.
- Kuhl H. Washing and sanitizing hatching eggs. *International Hatchery Practice.* 1987;2:20-1.
- Kutchai H, Steen JB. Permeability of the shell and shell membranes of hens' eggs during development. *Respir Physiol.* 1971;11(3):265-78.
- Lawrence D, Yoder K. Single dose of ethanol causes acute morphological defects in the chick embryo: A study of fetal alcohol syndrome. 2000 (zitiert vom 25.09.2006):1-10, http://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB_lab/Student/FAS/FAS.html
- Liebich H.-G. Funktionelle Histologie. 2. Aufl. Schattauer Verlag Stuttgart – New York; 1993.
- Lindackers M. Bruteidesinfektion mit Formaldehyd [Dissertation med. vet.]. Gießen: Justus- Liebig- Univ. Gießen; 1998.

Löffler G, Petrides EP. Biochemie und Pathobiochemie. 6. Aufl. Heidelberg: Springer – Verlag Berlin; 1998.

Lüpke N-P. Möglichkeiten und Grenzen einer toxikologischen Prüfung am Hühnerembryo [Habilschr. med. vet.] Münster: Westfälische Wilhelms- Univ. Münster; 1982.

Manasek FJ. Histogenesis of the embryonic myocardium. Am J Cardiol. 1970 Feb;25(2):149-68.

Manasek FJ. Myocardial development in the early chick embryo. J Morph. 1968;125:329-66.

Manley TC, Niegowsky SJ. Ozone. In: Encyclopaedia of chemical technology. 2.Aufl. New York: Wiley; 1967. S. 410-32.

Marzullo G. Production of chick chimaeras. Nature. 1970;225(5227):72-3.

Männer J. Cardiac looping in the chick embryo: A morphological review with special references to terminological and biomechanical aspects of the looping process. Anat Rec. 2000;259:248-62.

Männer J, Seidl W, Heinicke F, Hesse H. Teratogenic effects of suramin on the chick embryo. Anat Embryol. 2003 Jan 18;229-37.

Marcellus FN, Gwatkin R, Glover JS. Incubator disinfection in the control of Salmonella Pullorum. Proceedings of the 4th World's Poultry Congress; 1930 Jul 22-30; London, England. London: HM Stationary Off.; 1931.

Masshoff W, Stolpmann HJ. [Light and electron microscope studies on the chorion and calcium shell in the chicken egg.]. Z Zellforsch Mikrosk Anat. 1961;55:818-32.

Mayes FJ, Takeballi MA. Microbial contamination of the hen's egg. J. Food Protect. 1983;46:1092-98.

McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Wyllie AH, Orrenius S. Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. Toxicol Lett. 1988;42(2):123-30.

Meuer HJ, Baumann R. Oxygen pressure in intra- and extraembryonic blood vessels of early chick embryo. Resp Physiol. 1988;71:331-2.

Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi-Agro A. S-nitrosylation regulates apoptosis. Nature. 1997;388(6641):432-3.

Miller SL, Green LR, Peebles DM, Hanson, MA, Blanco CE. Effects of chronic hypoxia and protein malnutrition on growth in the developing chick. Am J Obstet Gynecol. 2002;186(2):261-7.

Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen. Wirkung von Ozon. 2011 (zitiert vom 04.02.2011):1-3
<http://www.umwelt.nrw.de/umwelt/luftqualitaet/ozon/wirkung.php>.

Moseley HR. Insulin - induced rumplessness of chickens. *J Exp Zool.* 1947;105:279.

Murray RG, Steed P, Elson HE. The location of the mucopeptide in sections of the cell wall of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Can J Microbiol.* 1965 Jun;11:547-60.

Narbaitz R, Kacew S. Ultrastructural and biochemical observations on the metanephros of normal and cultured chick embryos. *Anat Embryol.* 1978;155:95-105.

Neubert D, Merker HJ, Kwasikroch TE. *Methods in prenatal toxicology.* 2. Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag; 1977.

Ohlrogge JB, Kernan TP. Toxicity of activated oxygen: lack of dependence on membrane unsaturated fatty acid composition. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;113(1):301-8.

Pal L, Dublec K, Husveth F, Wagner L, Bartos A, Kovacs G. Effect of dietary fats and vitamin E on fatty acid composition, vitamin A and E content and oxidative stability of egg yolk. *Arch Geflügelk.* 2002;66:251-7.

Patten BM. The Formation of the Cardiac Loop in the Chick. *Am J Anat.* 1922;30:373-97.

Patten BM. *Early embryology of the chick.* 5. Aufl. New York: McGraw Hill; 1971.

Patterson JT. Studies on the early development of the hen's egg. *J Morph.* 1910;21, 101-134.

Perry SF, Duncker HR. Lung architecture volume and static mechanics in five species of lizards. *Respir Physiol.* 1978;34(1):61-81.

Peterka M, Mandys V, Viale M, Cafaggi S, Peterkova R, Esposito M. Embryotoxicity of cisplatin and a cisplatin-procaine complex (DPR) studied in chick embryo. *Neoplasma.* 2002;49(6):394-400.

Petitte JN, Clark ME, Liu G, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development.* 1990;108(1):185-9.

Piiper J, Tazawa H, Ar A, Rahn H. Analysis of chorioallantoic gas exchange in the chick embryo. *Respir Physiol.* 1980;39(3):273-84.

Prat R, Nofre C, Cier A. [Effects of sodium hypochlorite, ozone and ionizing radiations on the pyrimidine constituents of *Escherichia coli*]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1968;114(5):595-607.

Pryor WA, Church DF. Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radicals as mediators of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):41-6.

Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: The role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med.* 1995 Dec;19(6):935-41.

Pryor WA, Bermudez E, Cueto R, Squadrito GL. Detection of aldehydes in bronchoalveolar lavage of rats exposed to ozone. *Fundam Appl Toxicol.* 1996;34(1):148-56.

- Pulfer MK, Taube C, Gelfand E, Murphy RC. Ozone exposure in vivo and formation of biologically active oxysterols in the lung. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(1):256-64.
- Purton MD. The structure and ultrastructure of the liver in *Gallus domesticus*. *J Anat*. 1969;105(Pt 1):212.
- Quilligan JJ, Jr., Boche RD, Falk HL, Kotin P. The toxicity of ozone for young chicks. *AMA Arch Ind Health*. 1958;18(1):16-22.
- Reichl F, Schwenk M. *Regulatorische Toxikologie*. 2. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2004.
- Rice RG, Robson CM, Miller GW, Hill AG. Uses of ozone in drinking water treatment. *J Am Water Works Ass*. 1981;73(1):44-57.
- Rioch D. Morphology and behaviour of the migratory cells in tissue culture of the chick's spleen. *Anat Rec*. 1923 Feb;25(1):41-8.
- Romanoff AL. The study of respiratory behaviour of individual chicken embryos. *J Cell Comp Physiol*. 1941;18:199-214.
- Romanoff AL, Romanoff AJ. *The Avian Egg*. 1. Aufl. New York: John Wiley; 1949.
- Romanoff AL, Romanoff AJ. *The Avian Egg*. 4. Aufl. New York: John Wiley & Sons; 1963.
- Romanoff AL. *The Avian Embryo*. New York: Mcmillan; 1960.
- Romanoff AL, Romanoff A. Pathogenesis of the avian embryo; an analysis of causes of malformation and prenatal death. 1. Aufl. New York: Wiley Interscience; 1972.
- Romijn C. Foetal respiration in the hen. Gas diffusion through the egg shell. *Poult Sci*. 1950;29:24-8.
- Romijn C, Lokhorst W. Foetal heat production in the fowl. *J Physiol*. 1960;150:239-49.
- Rupp N. Der Einfluß einer Bruteidesinfektion mittels Ozon auf ausgewählte Eiinhaltsstoffe. [Dissertation med. vet] Leipzig: Univ. Leipzig; 2007.
- Rychter Z, Rycherova V. Angio- and myoarchitecture of the heart wall under normal and experimentally changing conditions. In: Pexieder T, Hrsg. *Perspectives in cardiovascular research. Mechanism of cardiac morphogenesis and teratogenesis*. New York: Raven Press; 1981. p. 431-52.
- Sabin FR. Electron microscopy of erythropoiesis in the avian yolk sac. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1921;32:314-21.
- Salomon FV. *Lehrbuch der Geflügelanatomie*. 1. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena; 1993.
- Sandstrom B, Westman J. Ultrastructure of the developing chicken liver before hatching. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1971;117(4):516-25.

Schneider BF, Norton S. Equivalent ages in rat, mouse and chick embryos. *Teratology*. 1979;19(3):273-8.

Schoenbein C.F. Recherches sur la nature de l'odeur qui se manifeste dans certaines actions chimiques. *C R Acad Sci*. 1840;10:706-710.

Schnorr B, Kressin M. *Embryologie der Haustiere*. 4. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2001.

Scott DBM. The effect of ozone on nucleic acids and their derivatives. In: W.J. Blogoslawski and R.G. Rice, Hrsg. *Aquatic Application of Ozone*. Syracuse, NY: International Ozone Institute; 1975. p. 226-40

Sedmera D, Pexieder T, Hu N, Clark EB. Developmental changes in the myocardial architecture of the chick. *Anat Rec*. 1997;248(3):421-32.

Sedmera D, Pexieder T, Vuillemin M, Thompson RP, Anderson RH. Developmental patterning of the myocardium. *Anat Rec*. 2000;258(4):319-37.

Sevanian A, Berliner J, Peterson H. Uptake, metabolism, and cytotoxicity of isomeric cholesterol-5,6-epoxides in rabbit aortic endothelial cells. *J Lipid Res*. 1991;32(1):147-55.

Shechter H. Spectrophotometric method for determination of ozone in aqueous solutions. *Water Res*. 1973;7:729-39.

Sheldon BW, Brown AL. Efficiency of ozone as an disinfectant for poultry carcasses and chill water. *J Food Sci*. 1986;51(2):305-9.

Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985;311(1152):617-31.

Siewert E, Bronsch K. *Die Eischale und das Ei*. Handbuch der Tierernährung Band 2. Berlin: Verlag Parey; 1972.

Simons PCM, Wiertz G. Notes on the structure of membranes and shell in the hen's egg. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1963;59:555-67.

Sissmann NJ. Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: Comparative Chronology. *Am J Cardiol*. 1970;25:141-8.

Stohl A, Rika A. *Ozon- Fluch oder Segen*. 2. Aufl. Wien: 1994.

Surai PF, Sparks NH, Noble RC. Antioxidant systems of the avian embryo: tissue-specific accumulation and distribution of vitamin E in the turkey embryo during development. *Br Poult Sci*. 1999;40(4):458-66.

Thorell B, Raunich L. Microspectrophotometric observation on erythrocyte development in the chick embryo. *Ann Med exp Fenn*. 1966;44:131-3.

Tonge M. Observation on the development of the semilunar valves of the aorta and pulmonary artery of the heart of the chick. Trans Roy Soc. 1869;159:387-412.

Tonkoff VN. Die Entwicklung der Milz bei Amnioten. Arch Mikroskop Anat. 1900;56:392-458.

Trambarulo R, Ghosh SN, Burrus CA Jr. and Gordy W. The molecular structure, dipole moment and g factor of ozone from its microwave spectrum. J Chem Phys. 1953;(21):851-5.

Uhlson C, Harrison K, Allen CB, Ahmad S, White CW, Murphy RC. Oxidized phospholipids derived from ozone-treated lung surfactant extract reduce macrophage and epithelial cell viability. Chem Res Toxicol. 2002;15(7):896-906.

Van Marum M. Description d'une très-grande machine électrique, placée dans le muséum de Teyler à Harlem, et des expériences faites par le moyen de cette machine. Paris: 1785.

Veninga TS. Toxicity of ozone in comparison with ionizing radiation. Strahlentherapie. 1967;134(3):469-77.

Wagensteen OD, Rahn H. Respiratory gas exchanges by the avian embryo. Respir Physiol. 1970;11:31-45.

Walker PR. The regulation of enzyme synthesis in animal cells. Essays Biochem. 1977;13:39-69.

Weintraub H, Cambell GLM, Holtzer H. Primitive erythropoiesis in early chick embryogenesis. J Cell Biol. 1971;50:652-68.

Whistler PE, Sheldon BW. Comparison of ozone and formaldehyde as poultry hatchery disinfectants. Poult Sci. 1989a;68(10):1345-50.

Whistler PE, Sheldon BW. Bactericidal activity, eggshell conductance, and hatchability effects of ozone versus formaldehyde disinfection. Poult Sci. 1989b;68(8):1074-7.

Whistler PE, Sheldon BW. Biocidal activity of ozone versus formaldehyde against poultry pathogens inoculated in a prototype setter. Poult Sci. 1989c;68(8):1068-73.

Williams JE. Effect of high-level formaldehyde fumigation on bacterial populations on the surface of chicken hatching eggs. Avian Dis. 1970;14(2):386-92.

Wolfstädter H, Bühring M. Einführung. In: Viebahn-Hänsler, Knoch, Beck, Hrsg. Ozon-Handbuch: Grundlagen, Prävention, Therapie. Landsberg/ Lech: Ecomed-Verlag; 2001. p. 1-6.

Wong GK, Cavey MJ. Development of the liver in the chicken embryo. I. Hepatic cords and sinusoids. Anat Rec. 1992;234(4):555-67.

World Health Organization (WHO). Principles for testing of drugs for teratogenicity. Techn Rep Ser. 364. Geneva: WHO 1967.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.

Yang PPW, Chen TC. Effects of ozone treatment on microflora of poultry meat. *J Food Process Preserv.* 1979;3:177-85.

Yassine F, Fedeka-Brunner B, Dieterlen-Lièvre F. Ontogeny of the chick embryo spleen – a cytological study. *Cell Differ Dev.* 1989;27(1):29-45.

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 1996 Apr 1;183(4):1533-44.

Zapp M. Untersuchung zur Embryotoxizität und Teratogenität von gesättigten aliphatischen Rhodaniden am Modell des Hühnerembryos [Dissertation med. vet]. Münster: Westfälische Wilhelms-Univ. Münster; 1976.

9 Anhang

Tab. A 1: Überlebensraten bis zum BT 18, 19 oder 20 bei der Begasung am BT 0, n.s.= nicht signifikant, signifikant bei $p<0,05$

Versuch		Tieranzahl	tot	lebend	ÜLR	Signifikanz
5%/1h	Kontrolle	5	0	5	100%	p<0,05
	Ozon	10	10	0	0%	
>5%/1h	Kontrolle	9	0	9	100%	p<0,05
	Ozon	29	28	1	3,3%	
5,22%/1h	Kontrolle	10	1	9	90%	p<0,05
	Ozon	10	9	1	10%	
5%/0min	Kontrolle	5	0	5	100%	n.s.
	Ozon	10	4	6	60%	
3%/20min	Kontrolle	5	0	5	100%	n.s.
	Ozon	13	3	10	76,9%	
2,8%/20min	Kontrolle	10	0	10	100%	n.s.
	Ozon	10	1	9	90%	
2,5%/40min	Kontrolle	10	0	10	100%	n.s.
	Ozon	11	2	9	81,8%	
1,9%/30min	Kontrolle	4	1	3	75%	n.s.
	Ozon	5	0	5	100%	
1,8%/17h	Kontrolle	10	1	9	90%	p<0,05
	Ozon	10	9	1	10%	
1%/2h	Kontrolle	10	0	10	100%	n.s.
	Ozon	10	0	10	100%	
1%/20min#	Kontrolle	10	0	10	100%	n.s.
	Ozon	10	0	10	100%	
1%/20min	Kontrolle	8	1	7	87,5%	n.s.
	Ozon	10	0	10	100%	
0,7%/2h (1)	Kontrolle	10	2	8	80%	n.s.
	Ozon	20	2	18	90%	
0,7%/2h (2)	Kontrolle	10	1	9	90%	n.s.
	Ozon	20	0	20	100%	
0,5%/24h	Kontrolle	10	0	10	100%	n.s.
	Ozon	10	0	10	100%	

**Tab. A 2: Überlebensraten bei der Begasung am BT 3, BT 4 oder BT 5 bei Entnahme am BT 8,
n.s.= nicht signifikant, signifikant bei $p<0,01$**

Versuch	Begasungstag		Tieranzahl	tot vor Beg.	tot nach Beg.	lebend am BT8	ÜLR	Signifikanz
5%/1h	BT 3	Kontrolle	20			20	100%	$p<0,01$
		Ozon	20	2	10	2	10,0%	
5%/1h	BT 4	Kontrolle	20			20	100%	$p<0,01$
		Ozon	20	4	10	0	0,0%	
5%/1h	BT 5	Kontrolle	20			18	90%	$p<0,01$
		Ozon	20	2	18	0	0,0%	

**Tab. A 3: Überlebensraten bei der Begasung am BT 3, BT 4 oder BT 5 bei Entnahme am BT 6,
n.s.= nicht signifikant, signifikant bei $p<0,01$**

Versuch	Begasungstag		Tieranzahl	tot vor Beg.	tot nach Beg.	lebend am BT6	ÜLR	Signifikanz
5%/1h	BT 3	Kontrolle	10			10	100%	$p<0,01$
		Ozon	30	8	20	2	6,7%	
5%/1h	BT 4	Kontrolle	10			10	100%	$p<0,01$
		Ozon	30	6	23	1	3,4%	
5%/1h	BT 5	Kontrolle	10			10	100%	$p<0,01$
		Ozon	30	2	28	0	0,0%	

Tab. A 4: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Gewichtsentwicklung bis zum BT 18, 19 oder 20 bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant, entf.= entfällt

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	>5%/1h	(n) MW in g Stabw.	1 19,9	entf.
K		(n) MW in g Stabw.	9 27,78 ±1,67	
Oz	5,22/1h	(n) MW in g Stabw.	1 19,50	entf.
K		(n) MW in g Stabw.	9 26,68 ±3,17	
Oz	5%/1h	(n) MW in g Stabw.	0	entf.
K		(n) MW in g Stabw.	10 28,81 ±3,22	
Oz	5%/-	(n) MW in g Stabw.	6 34,33 ±1,93	n.s.
K		(n) MW in g Stabw.	5 35,36 ±0,82	
Oz	3%/20min	(n) MW in g Stabw.	10 33,67 ±2,83	n.s.
K		(n) MW in g Stabw.	5 34,52 ±1,52	
Oz	2,8%/20min	(n) MW in g Stabw.	10 29,34 ±1,73	n.s.
K		(n) MW in g Stabw.	10 29,34 ±3,21	

Tab. A 5: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Gewichtsentwicklung bis zum BT 12 bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant, entf.= entfällt

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	5%/1h	(n) MW in g Stabw.	2 3,94 ±0,56	n.s.
K		(n) MW in g Stabw.	5 5,04 ±0,42	
Oz	5,22/1h	(n) MW in g Stabw.	1 3,75	entf.
K		(n) MW in g Stabw.	10 4,73 ±0,15	

Tab. A 6: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Gewichtsentwicklung bis zum BT 6 bei der Begasung mit hoher Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant, entf.= entfällt

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	5%/1h	(n) MW in g Stabw.	1 0,28	entf.
K		(n) MW in g Stabw.	4 0,42 ±0,003	
Oz	5,22/1h	(n) MW in g Stabw.	1 0,26	entf.
K		(n) MW in g Stabw.	8 0,43 ±0,02	

Tab. A 7: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Gewichtsentwicklung bis zum BT 18, 19 oder 20 bei der Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant, entf.= entfällt

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	1,9%/30min	(n)	5	n.s.
		MW in g	29,73	
		Stabw.	±2,78	
K		(n)	3	
		MW in g	31,00	
		Stabw.	±1,08	
Oz	1,8%/17h	(n)	1	entf.
		MW in g	26,20	
		Stabw.		
K		(n)	5	
		MW in g	37,82	
		Stabw.	±1,33	
Oz	2,5%/40min	(n)	9	n.s.
		MW in g	27,98	
		Stabw.	±1,90	
K		(n)	10	
		MW in g	28,53	
		Stabw.	±1,72	

Tab. A 8: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Gewichtsentwicklung bis zum BT 12 bei Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	2,5%/40min	(n)	9	n.s
		MW in g	5,07	
		Stabw.	±0,64	
K		(n)	10	
		MW in g	4,95	
		Stabw.	±0,42	

Tab. A 9: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Gewichtsentwicklung bis zum BT 6 bei der Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	2,5%/40min	(n) MW in g Stabw.	9 0,44 ±0,02	n.s.
K		(n) MW in g Stabw.	9 0,48 ±0,07	

Tab. A 10: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Gewichtsentwicklung bis zum BT 18, 19 oder 20 bei der Begasung mit niedriger Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	1%/2h	(n) MW in g Stabw.	10 26,8 1,19	n.s.
K		(n) MW in g Stabw.	10 26,35 1,2	
Oz	1%/20min #	(n) MW in g Stabw.	10 27,78 3,64	n.s.
K		(n) MW in g Stabw.	10 28,81 3,22	
Oz	1%/20min	(n) MW in g Stabw.	10 35,02 2,06	n.s.
K		(n) MW in g Stabw.	7 36,94 2,49	
Oz	0,7%/2h (1)	(n) MW in g Stabw.	18 19,27 1,18	n.s.
K		(n) MW in g Stabw.	8 18,69 0,76	
Oz	0,7%/2h (2)	(n) MW in g Stabw.	20 23,97 1,6	n.s.
K		(n) MW in g Stabw.	9 23,48 1,15	
Oz	0,5%/24h	(n) MW in g Stabw.	9 21,97 2,16	n.s.
K		(n) MW in g Stabw.	10 22,07 3,35	

Tab. A 11: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Gewichtsentwicklung bis zum BT 12 bei Begasung mit niedriger Ozonkonzentration am BT 0, signifikant bei $p < 0,05$

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	1%/20min#	(n)	10	$p < 0,05$
		MW in g	5,06	
		Stabw.	$\pm 0,60$	
K		(n)	5	$p < 0,05$
		MW in g	4,37	
		Stabw.	$\pm 0,42$	

Tab. A 12: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Gewichtsentwicklung bis zum BT 6 bei Begasung mit niedriger Ozonkonzentration am BT 0, signifikant bei $p < 0,01$

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	1%/20min#	(n)	10	$p < 0,01$
		MW in g	0,37	
		Stabw.	$\pm 0,01$	
K		(n)	4	$p < 0,01$
		MW in g	0,42	
		Stabw.	$\pm 0,001$	

Tab. A 13: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Längenentwicklung bis zum BT 18,19 oder 20 bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant, entf.= entfällt

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	>5%/1h	(n) MW in cm Stabw.	1 10,70	entf.
K		(n) MW in cm Stabw.	9 12,17 ±0,60	
Oz	5,22/1h	(n) MW in cm Stabw.	1 11,20	entf.
K		(n) MW in cm Stabw.	9 11,78 ±0,83	
Oz	5%/1h	(n) MW in cm Stabw.	0	entf.
K		(n) MW in cm Stabw.	10 11,45 ±0,4	
Oz	5%/-	(n) MW in cm Stabw.	6 11,20 ±0,57	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	5 11,78 ±0,34	
Oz	3%/20min	(n) MW in cm Stabw.	10 10,64 ±0,21	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	5 10,84 ±0,5	
Oz	2,8%/20min	(n) MW in cm Stabw.	10 11,62 ±0,83	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	5 11,48 ±0,28	

Tab. A 14: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Längenentwicklung bis zum BT 12 bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration am BT 0, signifikant bei $p < 0,05$, entf.= entfällt

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	5%/1h	(n) MW in cm Stabw.	2 3,94 $\pm 0,56$	p < 0,05
K		(n) MW in cm Stabw.	5 5,04 $\pm 0,42$	
Oz	5,22/1h	(n) MW in cm Stabw.	1 5,20	entf.
K		(n) MW in cm Stabw.	10 6,09 $\pm 0,33$	

Tab. A 15: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Längenentwicklung bis zum BT 6 bei Begasung mit hoher Ozonkonzentration am BT 0, entf.= entfällt

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	5%/1h	(n) MW in cm Stabw.	1 0,28	entf.
K		(n) MW in cm Stabw.	4 0,42 $\pm 0,003$	
Oz	5,22/1h	(n) MW in cm Stabw.	1 0,25	entf.
K		(n) MW in cm Stabw.	8 0,43 $\pm 0,04$	

Tab. A 16: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Längenentwicklung bis zum BT 18, 19 oder 20 bei Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant, entf.= entfällt

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	1,9%/30min	(n) MW in cm Stabw.	5 10,70 ±0,31	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	3 10,53 ±0,42	
Oz	1,8%/17h	(n) MW in cm Stabw.	1 9,50	entf.
K		(n) MW in cm Stabw.	5 11,32 ±0,22	
Oz	2,5%/40min	(n) MW in cm Stabw.	9 12,27 ±0,40	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	10 12,09 ±0,15	

Tab. A 17: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Längenentwicklung bis zum BT 12 bei Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	2,5%/40min	(n) MW in cm Stabw.	9 6,57 ±0,46	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	10 6,41 ±0,27	

Tab. A 18: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Längenentwicklung bis zum BT 6 bei Begasung mit mittlerer Ozonkonzentration am BT 0, signifikant bei $p < 0,01$

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	2,5%/40min	(n)	9	p<0,01
		MW in cm	4,41	
		Stabw.	±0,23	
K		(n)	9	
		MW in cm	4,69	
		Stabw.	±0,21	

Tab. A 19: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Längenentwicklung bis zum BT 18,19 oder 20 bei Begasung mit niedriger Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	1%/2h	(n) MW in cm Stabw.	10 11,32 0,27	n.s
K		(n) MW in cm Stabw.	10 11,06 0,37	
Oz	1%/20min #	(n) MW in cm Stabw.	10 11,40 0,34	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	10 11,45 0,4	
Oz	1%/20min	(n) MW in cm Stabw.	10 10,53 0,49	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	7 10,71 0,22	
Oz	0,7%/2h (1)	(n) MW in cm Stabw.	18 10,66 0,44	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	8 10,70 0,77	
Oz	0,7%/2h (2)	(n) MW in cm Stabw.	20 11,50 0,39	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	9 11,34 0,23	
Oz	0,5%/24h	(n) MW in cm Stabw.	9 11,01 0,39	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	10 11,17 0,55	

Tab. A 20: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Längenentwicklung bis zum BT 12 bei der Begasung mit niedriger Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	1%/20min#	(n) MW in cm Stabw.	10 7,31 ±0,12	n.s.
K		(n) MW in cm Stabw.	5 7,08 ±0,22	

Tab. A 21: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Längenentwicklung bis zum BT 6 bei Begasung mit niedriger Ozonkonzentration am BT 0, n.s.= nicht signifikant, signifikant bei $p<0,05$

Gruppe	Ozonk./EWZ	Statistische Maßnahme		Signifikanz
Oz	1%/20min#	(n) MW in cm Stabw.	10 5,24 ±0,20	$p<0,01$
K		(n) MW in cm Stabw.	4 5,68 ±0,13	

Tab. A 22: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Gewichtsentwicklung der lebenden Tiere am ET 8 der Versuche zur Phasenspezifität, signifikant bei $p < 0,05$, entf.= entfällt

Versuch	Gruppe		Statistische Maßnahme		Signifikanz
PS BT 3 ET 8	Oz	lebend am ET 8 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	2 0,74 $\pm 0,18$	p<0,05
	K	lebend am ET 8 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	20 1,13 $\pm 0,15$	
PS BT 4 ET 8	Oz	lebend am ET 8 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	0	entf.
	K	lebend am ET 8 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	20 0,84 $\pm 0,10$	
PS BT 5 ET8	Oz	lebend am ET 8 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	0	entf.
	K	lebend am ET 8 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	18 0,89 $\pm 0,11$	

Tab A 23. Mittelwert (MW) und Standardabweichung für die Gewichtsentwicklung der lebenden Tiere am ET 6 der Versuche der Phasenspezifität, signifikant bei $p < 0,05$, entf.= entfällt

Versuch	Gruppe		Statistische Maßnahme		Signifikanz
PS BT 3 ET 6	Oz	lebend am ET 6 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	2 0,28 $\pm 0,05$	$p < 0,05$
	K	lebend am ET 6 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	10 0,40 $\pm 0,04$	
PS BT 4 ET 6	Oz	lebend am ET 6 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	1 0,39	entf.
	K	lebend am ET 6 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	10 0,38 $\pm 0,03$	
PS BT 5 ET 6	Oz	lebend am ET 6 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	0	entf.
	K	lebend am ET 6 Gewicht in g	(n) MW Stabw.	10 0,38 $\pm 0,03$	

Tab. A 24: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw.) für die Scheitel-Steiß-Längenentwicklung am ET 6 der Versuche zur Phasenspezifität, signifikant bei $p < 0,05$, entf.= entfällt

Tag	Gruppe		Statistische Maßnahme		Signifikanz
PS BT 3 ET 6	Oz	lebend am ET 6 SSL in cm	(n) MW Stabw.	2 3,75 $\pm 0,21$	$p < 0,05$
	K	lebend am ET 6 SSL in cm	(n) MW Stabw.	10 4,19 $\pm 0,09$	
PS BT 4 ET 6	Oz	lebend am ET 6 SSL in cm	(n) MW Stabw.	1 4,3	entf.
	K	lebend am ET 6 SSL in cm	(n) MW Stabw.	10 4,27 $\pm 0,25$	
PS BT 5 ET 6	Oz	lebend am ET 6 SSL in cm	(n) MW Stabw.	0	entf.
	K	lebend am ET 6 SSL in cm	(n) MW Stabw.	10 4,53 $\pm 0,54$	

Danksagung

Hiermit möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran danke ich Herrn Prof. J. Seeger für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation sowie für die Möglichkeit der Anfertigung dieser am Veterinäranatomischen Institut.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anke Hoffmann für ihre fachliche Beratung und Betreuung sowohl im theoretischen, wissenschaftlichen als auch im praktischen Bereich, sowie für ihre stete Motivation, Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Allen Mitarbeitern des Veterinär-Anatomischen Instituts möchte ich für die herzliche Aufnahme und das freundliche Arbeitsklima danken; Herrn Dr. J. Kacza, Frau G. Lindner, Frau H. Arnold, Frau S. Kauschke und Herrn M. Reinhardt danke ich für die Einarbeitung sowie für die Hilfe bei der Aufbereitung der Proben und für die technische Unterstützung.

Weiterhin bedanke ich mich beim Institut für Lebensmittelhygiene für die Zurverfügungstellung der Gerätschaften und Räume für die experimentellen Versuche.

Desweiteren danke ich Herrn A. Richter, Mitarbeiter der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät in Leipzig, für die geduldige Unterstützung in allen statistischen Fragen.

Nicht zuletzt gilt mein innigster Dank meiner gesamten Familie für ihr Vertrauen, ihre Liebe und ihre Unterstützung in den vergangenen Jahren, die mir vor allem in schwierigen Phasen Kraft und Rückhalt gab.